

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS RIVIÈRES

THÈSE PRÉSENTÉE À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
MICHEL GRANDBOIS

MÉCANISME D'ACTION DES PHOSPHOLIPASES A2 ET C
SUR DES MONOCOUCHEs DE PHOSPHOLIPIDES
À L'INTERFACE AIR-EAU

DÉCEMBRE 1996

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

Les phospholipases sont les enzymes responsables de l'hydrolyse des phospholipides constituant les membranes cellulaires. Les phospholipases A2 (PLA2) et C (PLC) hydrolysent, respectivement, le lien acyl-ester sn-2 et phosphoester des phospholipides. Ces enzymes sont connues pour avoir une activité hydrolytique beaucoup plus élevée en présence de substrats lipidiques organisés. Dans ce travail, nous avons étudié l'action de ces phospholipases sur des substrats lipidiques en monocouche à l'interface air-eau. De façon plus spécifique, nous avons étudié le mécanisme de formation des domaines de PLA2 à l'interface air-eau à l'aide de mesures de variation d'aire moléculaire, de potentiel de surface, de microscopie à épifluorescence et de spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS). Ces mesures ont permis de montrer que la présence d'acides gras était essentielle à la formation de ces domaines de PLA2. De plus, nos résultats suggèrent que la présence de lysophospholipide et/ou de phospholipide non hydrolysé pourrait être responsable de la forme chirale des domaines de PLA2. Les mesures de PM-IRRAS ont confirmé l'importance du calcium dans le processus de séparation de phase des acides gras qui précède la formation des domaines de PLA2. Les spectres PM-IRRAS ont montré qu'il est possible de suivre l'hydrolyse de films lipidiques par la PLA2 ou la PLC à l'aide des changements dans les bandes infrarouge caractéristiques des phospholipides à l'interface air-eau. Nous avons aussi voulu déterminer l'origine moléculaire du synergisme entre la PLA2 et un peptide appelé mélittine. À l'aide de mesures de variation d'aire moléculaire et de potentiel de surface, nous avons montré l'importance des

charges de la méliittine dans l'activation de la PLA2. De plus, des mesures en microscopie à épifluorescence ont permis de montrer que l'activation de la PLA2 était aussi due à la création de défauts dans l'organisation du film lipidique.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, le professeur Christian Salesse. Je le remercie pour l'appui inconditionnel qu'il m'a apporté tout au long de mes études graduées. Mon directeur de recherche fut pour moi, jusqu'à présent, le meilleur exemple d'implication et de rigueur sur le plan scientifique. Enfin, je lui suis très reconnaissant de m'avoir permis d'effectuer de nombreux stages de recherche à l'extérieur du Québec.

Je remercie messieurs Michel Pézolet, Michel Lafleur, Pierre Tancrède et François Boucher d'avoir accepté d'examiner cette thèse dans un laps de temps très court. Un remerciement tout particulier à François Boucher pour sa grande disponibilité et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier Gaétan Munger, André Paquette et Alain Tessier, du Centre de Recherche en Photobiophysique pour leur soutien technique et Robert Drolet, Dany Lemay de l'atelier mécanique pour la réalisation de nombreux montages expérimentaux.

Je remercie Bernard Desbat et Daniel Blaudez pour l'expertise apportée lors des mesures de spectroscopie PM-IRRAS réalisées dans leurs laboratoires de l'Université de Bordeaux. Je les remercie d'avoir contribué à la publication des résultats de ces expériences. Je remercie également Luc Lebeau et Patrick Schultz de l'Université de Strasbourg pour les expériences de microscopie électronique effectuées dans leurs laboratoires. Je tiens aussi à remercier

Mathias Lösche et David Vaknin pour les expériences de reflectivité des neutrons réalisées au Denmark. Je remercie également David Grainger et Kevin Maloney pour leurs contributions dans les expériences de microscopie à épifluorescence faites à Portland en Oregon. Je voudrais aussi remercier Jean Dufourcq du centre de recherche Paul Pascal d'avoir fourni les peptides analogues de la mélittine et d'avoir contribué à la publication des résultats de ces expériences. Enfin, je remercie Mary Roberts pour la synthèse des lipides asymétriques utilisés dans ce travail.

En terminant, je remercie tout mes collègues et amis d'avoir agrémenté mes études graduées de sourires, de discussion, d'activités et de partys. Merci à Pierre Lavigne, Philippe Desmeules, Jean Désilets, Mario Méthot, Patrick Lague, Michèle Jacob, Judith Gallant, Hugo Lavoie, Philippe Bélanger, Samir Élouatik, Michel Déry, Thiery Lebihan, Normand Beaudoin, Isabelle Rivard, Sylvie Gélinas, Serge Groleau, Steve Bourgoïn. Un merci tout particulier à Philippe Desmeules pour son aide très précieuse dans la réalisation de ce manuscrit.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xix

CHAPITRES

I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Les membranes biologiques.....	1
1.1.1 Diversité et fonctions des membranes.....	1
1.1.2 Organisation et composition des membranes.....	2
1.2 Les phospholipases	9
1.2.1 La phospholipase A2 (PLA2).....	11
1.2.1.1 Fonction et types de PLA2.....	11
1.2.1.2 Mécanisme d'hydrolyse de phospholipides par la PLA2.....	11
1.2.2 La phospholipase C (PLC).....	14
1.2.2.1 Fonction et types de PLC.....	14
1.2.2.2 Mécanisme d'hydrolyse de phospholipides par la PLC.....	16

1.3	Synergie méliittine-PLA2.....	17
1.3.1	Structure de la méliittine.....	17
1.3.2	Nature du synergisme.....	22
1.4	Problématique de la recherche.....	23
1.4.1	Organisation et composition des domaines de PLA2.....	23
1.4.2	Nature de l'effet synergique entre la PLA2 et la méliittine.....	26
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	27
2.1	Système modèle des monocouches: généralités.....	27
2.1.1	La technique des monocouches.....	28
2.1.2	L'aire moléculaire.....	30
2.1.3	La pression de surface.....	32
2.1.4	Le potentiel de surface.....	33
2.2	Mesure de l'hydrolyse des monocouches à pression constante.....	35
2.2.1	Préparation des monocouches et injection de la PLA2.....	38
2.2.2	Hydrolyse de monocouches de DDPC et DDPC-peptide.....	38
2.2.3	Hydrolyse de monocouches de C6C16-PC et C16C6-PC.....	39
2.2.4	Hydrolyse de monocouches de DPPC et DPPC-peptide.....	42
2.3	La microscopie à épifluorescence.....	42
2.3.1	Visualisation de transitions de phase par microscopie à épifluorescence.....	44

2.3.2	Marquage de la PLA2.....	47
2.4	Spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS).....	47
2.4.1	Particularités de la mesure.....	51
2.4.2	Mesure des spectres PM-IRRAS.....	53
III.	ÉTUDE DE LA COMPOSITION DES DOMAINES DE PLA2 EN MONOCOUCHE À L'INTERFACE AIR-EAU: MESURES D'ÉPIFLUO- RESCENCE, DE VARIATION D'AIRE MOLÉCULAIRE ET DE POTENTIEL DE SURFACE.....	54
3.1	Introduction.....	54
3.2	Résultats.....	58
3.2.1	Cinétique d'hydrolyse des lipides asymétriques.....	58
3.2.2	Visualisation de la formation de domaines lors de l'hydrolyse des lipides asymétriques et du PAF.....	67
3.3	Discussion.....	72
IV.	ETUDE DE LA COMPOSITION DES DOMAINES DE PLA2 EN MONOCOUCHE À L'INTERFACE AIR-EAU: MESURES PAR PM- IRRAS.....	83
4.1	Introduction.....	83

4.2	Résultats.....	85
4.2.1	Hydrolyse du DPPC par la PLA2.....	85
4.2.2	Hydrolyse du C16C6-PC.....	88
4.2.3	Hydrolyse du C6C16-PC.....	91
4.2.4	Spectre de la PLA2 à l'interface.....	94
4.3	Discussion.....	97
V.	MESURE DE L'HYDROLYSE PAR LA PLC DE MONOCOUCHEs DE PHOSPHOLIPIDES À L'INTERFACE AIR-EAU.....	101
5.1	Introduction.....	101
5.2	Résultats et discussion.....	102
5.2.1	Changements dans la bande des C=O ester.....	102
5.2.2	Changements dans la bande des CH ₂	108
5.2.3	Mesure quantitative de l'hydrolyse à l'aide de la bande des phosphates.....	108
5.2.4	Cinétique d'hydrolyse du DPPC par la PLC.....	110
VI.	ÉTUDE DU SYNERGISME ENTRE LA PLA2 ET LA MÉLITTINE.....	113
6.1	Introduction.....	113
6.2	Résultats et discussion.....	115
6.2.1	Hydrolyse de monocouches de DDPC en présence et en absence de peptides.....	115

6.2.2 Hydrolyse de monocouches de DPPC en présence et en absence de peptides.....	119
6.2.3 Note sur les concentrations de peptides utilisées.....	121
6.2.4 Visualisation de monocouches de DPPC dans la transition de phase à l'aide de peptides marqués.....	124
6.2.5 Visualisation de l'hydrolyse de monocouches de DPPC dans la transition de phase en présence et en absence de peptides.....	126
 IV. CONCLUSION.....	 129
 RÉFÉRENCES.....	 133

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1	Modèle de l'organisation en mosaïque fluide des membranes cellulaires...3
2	Structure générale d'un glycérophospholipide.....3
3.	Organisation des phospholipides dans les phases lamellaires $L\alpha$ et $L\beta$6
4	Types de protéines membranaires.....8
5	Position du lien chimique dans l'action des différentes phospholipases...10
6	Hydrolyse du DPPC par la PLA2.....12
7	Structure de la PLA2 de venin d'abeille montrant un phospholipide (molécule en noir) dans le site de liaison.....15
8	Schéma du site de liaison et du site d'hydrolyse de la PLA2.....15
9	Hydrolyse de la DPPC par la PLC.....18
10	Courbure négative et positive d'une membrane.....19

11	Structure de la mélattine.....	21
12	Schéma de la liaison de la mélattine à une membrane lipidique.....	21
13	Micrographies de l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC dans la transition de phase de liquide-expansé à liquide-condensé.....	24
14	Schéma d'une cuve de Langmuir typique.....	29
15	(a) Isotherme de l'acide arachidique sur l'eau. (b) Section transverse d'une chaîne d'acide gras.....	31
16	Comparaison entre les cinétiques d'hydrolyse de monocouches lipidiques par la PLA2 obtenues avec (a) une cuve rectangulaire et (b) une cuve d'ordre zéro.....	36
17	Schéma du masque ajouté à une cuve rectangulaire pour obtenir une cinétique d'ordre zéro.....	37
18	Hydrolyse des phospholipides asymétriques par la PLA2 (a) C6C16-PC et (b) C16C6-PC.....	40
19	Microscope à épifluorescence monté au-dessus d'une cuve de Langmuir.....	43
20	Isotherme du DPPC et visualisation de la transition de phase de liquide expansé à solide condensé par microscopie à épifluorescence.....	46

21	Schéma du montage de spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air-eau.....	49
22	Définition du référentiel de la monocouche et du déphasage introduit dans le champ électrique du faisceau.....	50
23	Variations calculées du signal PM-IRRAS en fonction de l'angle d'incidence pour des absorptions situées parallèlement (x,y) et perpendiculairement (z) au plan de la surface.....	53
24	Isotherme du DPPC montrant la transition de phase à 7-8 mN/m.....	55
25	Modèle de formation des domaines de PLA2 à l'interface air-eau tel que proposé par Grainger et al. (1989).....	56
26	Modèle de formation des domaines de PLA2 à l'interface air-eau tel que proposé par Reichert et al. (1992).....	56
27	Isotherme du C16C6-PC (—) et du C6C16-PC (- - -).....	59
28	Graphique du potentiel de surface (—) et de l'aire moléculaire (- - -) en fonction du temps d'hydrolyse par la PLA2 d'une monocouche de C16C6-PC à pression de surface constante (15 mN/m).....	61
29	Graphique du potentiel de surface (—) et de l'aire moléculaire (- - -) en fonction du temps d'hydrolyse par la PLA2 d'une monocouche de C6C16-PC à pression de surface constante (15 mN/m).....	62

- 30 (a) Variation de l'aire moléculaire à la fin de l'hydrolyse du C16C6-PC. (b) Variation de l'aire moléculaire d'une monocouche de C16Lyso-PC à pression constante (15 mN/m).....65
- 31 (a) Variation de l'aire moléculaire à la fin de l'hydrolyse du C6C16-PC. (b) Variation de l'aire moléculaire d'une monocouche d'acide palmitique à pression constante (15 mN/m).....66
- 32 Micrographie de l'hydrolyse du C6C16-PC par la PLA2 après 60 min à une pression de surface de 15 mN/m.....68
- 33 Micrographie de l'hydrolyse du C16C6-PC par la PLA2 après 60 min à une pression de surface de 15 mN/m.....68
- 34 Micrographies obtenues suite à l'injection de PLA2 marquée dans la sous-phase d'un film d'acide palmitique pur à une pression de 15 mN/m avant (a) et après décompression jusqu'à 0 mN/m (b).....71
- 35 Effet de l'injection de la PLA2 dans la sous-phase d'une monocouche de DPPC (2 mol% de lipide rhodamine) à une pression de surface située juste avant sa transition de phase liquide-expansé à solide-condensé.....75
- 36 Injection de PLA2 marquée dans la sous-phase d'une monocouche composée de DSPA dans la phase solide-condensé dans une matrice fluide de DOPC en phase liquide-expansé.....81

37	Domaines chiraux de DPPC dans la transition de phase liquide-étendu à solide-condensé.....	81
38	Spectres PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC par la PLA2 à 8 mN/m. (a) Monocouche de DPPC pur avant l'injection de la PLA2. (b) après 10 min, (c) 25 min, (d) 50 min, (e) 70 min, (f) 90 min.....	86
39	Spectre PM-IRRAS d'une monocouche de C16Lyso-PC pur à 8 mN/m.....	89
40	Spectre PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de C16C6-PC par la PLA2 à 8 mN/m. (a) Monocouche de C16C6-PC pur avant l'injection de l'enzyme et (b) après 60 min d'hydrolyse par la PLA2.....	90
41	Spectre PM-IRRAS d'une monocouche d'acide palmitique à 8 mN/m.....	92
42	Spectre PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de C6C16-PC par la PLA2 à 8 mN/m. (a) Monocouche de C6C16-PC pur avant l'injection de l'enzyme et (b) après 60 min d'hydrolyse par la PLA2.....	93
43	Spectre IR de la PLA2 dans différents états. (a) Spectre d'absorption dans l'état solide (spectre de poudre) et (b) spectre de différence obtenu en soustrayant le spectre PM-IRRAS (spectre c) de la PLA2 adsorbée à une monocouche mixte (DPPC:acide palmitique:C16Lyso-PC, 20:40:40) du spectre PM-IRRAS de cette monocouche mixte en absence de PLA2 (spectre d).....	95

44	Spectre PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC par la PLC à 8 mN/m. (a) Monocouche de DPPC pur avant l'injection de l'enzyme et (b) après 60 min d'hydrolyse par la PLC. (c) Spectre de différence (spectres b - a).....	104
45	Positions des carbones sn-1 et sn-2 du groupement glycérol pour le DPPC.....	105
46	Spectre PM-IRRAS d'une monocouche (a) de DPPC pur et (b) de DPG pur à 8 mN/m.....	107
47	Graphique du potentiel de surface à pression constante (7mN/m) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DPPC par la PLC.....	111
48	Projection des peptides analogues montrant le caractère amphiphile des hélices alpha.....	114
49	Graphique de l'aire moléculaire à pression de surface constante (15 mN/m) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DDPC.....	116
50	Graphique du potentiel de surface à pression de surface constante (7 mN/m) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DPPC.....	120

- 51 Spectre PM-IRRAS d'une monocouche composée d'un mélange de DPPC:acide palmitique (1:1) en absence (a) et en présence (b) de LK22.....123
- 52 Micrographie d'épifluorescence d'une monocouche de DPPC dans la transition de phase de liquide-expansé à liquide-condensé (7 mN/m) en présence de 3% de peptide dansylé (LK22-DNS).....125
- 53 Micrographie à épifluorescence montrant l'hydrolyse par la PLA2 d'une monocouche de DPPC dans la transition de phase de liquide-expansé à solide-condensé (7 mN/m). (a) Monocouche de DPPC pur, (b) monocouche de DPPC en présence de LK22 après 1 min d'hydrolyse, (c) après 10 min.....127

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1. Composition de quelques membranes cellulaires.....	4
2. Structure de la mélittine et de ses analogues.....	114
3. Vitesse d'hydrolyse des monocouches de DDPC et DDPC-peptides calculée à partir de la pente des cinétiques de la figure 44.....	118
4. Vitesse d'hydrolyse des monocouches de DPPC et DPPC-peptides calculées à partir de la pente des cinétiques de la figure 45.....	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Aire moléculaire
Å	Angström
BSA	Albumine bovine
C16	Acide palmitique
C16C6-PC	1-palmitoyl-2-caproyl-sn-3-phosphatidylcholine
C16Lyso-PC	Palmitoyl-lysophosphatidylcholine
C6	Acide caproïque
C6C16-PC	1-caproyl-2-palmitoyl-sn-3-phosphatidylcholine
C6Lyso-PC	Caproyl-lysophosphatidylcholine
DDPC	Didécanyolphosphatidylcholine
DNS	Dansyle
DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
DPG	Dipalmitoylglycérol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPA	Acide distearéoyphosphatidique
F	Fluorescéine
K	Lysine
L	Leucine
MEL	Mélettine
PAF	1- <i>o</i> -alkyl-2-acétyl- <i>sn</i> -3-phosphatidylcholine
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D

PM-IRRAS	Spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation
R	Réfectivité
Rho	Rhodamine
S	Signal PM-IRRAS
V	Potentiel de surface
ψ	Potentiel électrostatique
μ	Moment dipolaire
Π	Pression de surface

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 LES MEMBRANES BIOLOGIQUES

1.1.1 Diversité et fonction des membranes

Les membranes lipidiques jouent un rôle primordial dans le maintien des structures et fonctions de toutes les cellules vivantes. Le cloisonnement est sans aucun doute le plus trivial des rôles des membranes. En effet, les membranes permettent de compartimenter et ainsi d'isoler le contenu cellulaire de son environnement immédiat. Les membranes rendent aussi possible la différenciation de différents organites cellulaires incluant les mitochondries, les chloroplastes, le noyau cellulaire et l'appareil de Golgi (Lehninger, 1982). En plus de leur rôle de cloisonnement, les membranes déterminent la nature de toutes les communications et échanges entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. Même si les membranes forment une barrière très efficace contre les ions inorganiques, elles permettent cependant le passage, à différents degrés, de certaines molécules organiques (Deamer et Bramhall, 1986; Walter et Gutknecht, 1986). D'autre part, la présence de pores, de canaux et de transporteurs dans les membranes permettent de contrôler, de façon plus spécifique, le flux de certains ions entre l'extérieur et l'intérieur des cellules (Eisenman et Dani, 1987; Gennis, 1989). Les gradients de concentration de ces ions peuvent alors être impliqués dans l'activation-inactivation de certaines enzymes ou encore dans la transmission d'influx nerveux (Guy et Hucho, 1987). À ces fonctions liées à la propriété de cloisonnement de la

membrane, s'ajoute un grand nombre de fonctions associées à l'action de certaines protéines ou enzymes. En effet, la présence de protéines membranaires telles que les intégrines, au niveau des membranes, permet la fixation de protéines du cytosquelette comme les filaments d'actine et d'autres de la matrice extracellulaire comme la fibronectine (Ruoslahti et Pierschbacher, 1987). Les membranes sont aussi impliquées dans un grand nombre de réactions enzymatiques (Casey, 1984) ainsi que dans plusieurs processus de transduction d'énergie et de signalisation cellulaire (Kouyama et al., 1987), de fusion (Gething et al., 1986) et de sécrétion cellulaire (Stein, 1986). Elles jouent aussi un rôle de matrice lipidique organisée pour un grand nombre d'enzymes impliquées dans le catabolisme des lipides (Van den Bosch, 1980). Les différents types de lipases sont des exemples de ces enzymes.

1.1.2 Organisation et composition des membranes

Les membranes biologiques sont essentiellement composées de lipides, protéines et d'hydrates de carbones qui sont, quant à eux, associés aux protéines ou aux lipides. Un schéma typique d'organisation des membranes est présenté à la figure 1. Dans ce modèle (Singer et Nicholson, 1972), les lipides forment deux couches interagissant entre eux par leur partie hydrophobe, les parties polaires se retrouvant quant à elles en contact avec l'eau (voir aussi figure 2). La propriété la plus étonnante des lipides membranaires est leur énorme diversité: plusieurs membranes contiennent au-delà de 100 lipides différents (Gennis, 1989). Le rôle sans doute le plus important des lipides est donc de former la structure en bicouche caractéristique des membranes biologiques.

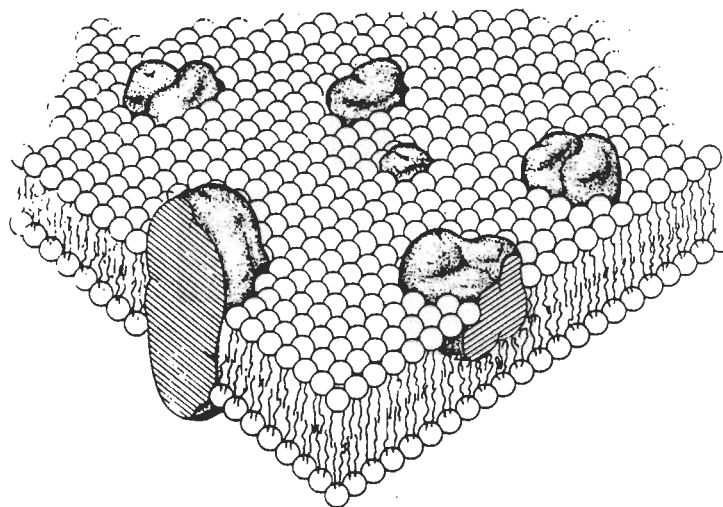


Figure 1 Modèle de l'organisation en mosaïque fluide des membranes cellulaires (Singer et Nicholson, 1972).

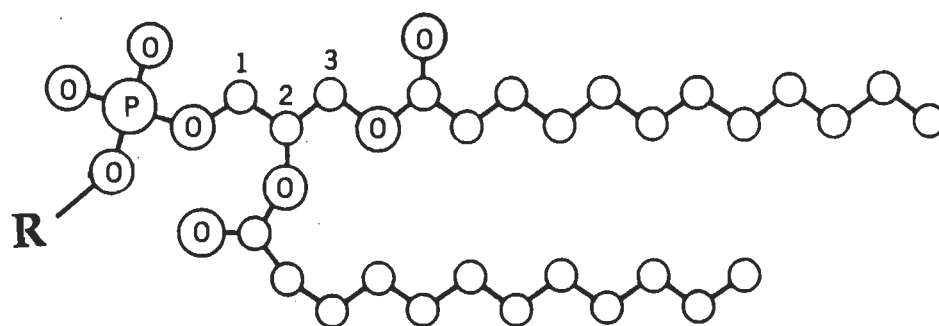


Figure 2 Structure générale d'un glycérophospholipide (Jain, 1988).

Les glycérophospholipides (figure 2) qui représentent la composante lipidique la plus importante des membranes (voir tableau 1) sont tenus comme principaux responsables de ce rôle (Cullis et al., 1986). En effet, la majorité des lipides de cette famille ont une forte tendance à former naturellement des phases lamellaires en présence d'eau. Les phases lamellaires $L\alpha$ et $L\beta$ (figure 3) correspondent, respectivement, aux états fluide et gel d'une bicouche lipidique (Blume, 1983; Jain, 1988) et certains lipides membranaires, comme le cholestérol, ne peuvent former de phases lamellaires $L\alpha$ et $L\beta$ alors que d'autres, comme la dipalmitoylphosphatidylcholine, en forment spontanément.

La longueur et la présence d'insaturations sur les chaînes aliphatiques des lipides modulent de façon très efficace l'état physique de la membrane. Ainsi, les phospholipides à chaînes aliphatiques très longues (18-22 carbones) possèdent une température de transition de l'état gel ($L\beta$) à l'état fluide ($L\alpha$) très élevée, alors que les phospholipides à courtes chaînes (8-12 carbones) ont une température de transition très faible (Blume, 1983). La présence d'insaturation dans la chaîne aliphatique abaisse de façon considérable la température de transition d'un phospholipide (Marsh, 1990). En plus de ce rôle structural, les lipides assurent de nombreux rôles beaucoup plus spécifiques dont voici quelques exemples. La forme de certains lipides comme les cérébrosides est, en effet, nécessaire pour stabiliser les régions très courbées de certaines membranes (Curatolo et Neuringer, 1986) alors que certains lipides à chaînes ramifiées sont requis pour assurer une organisation optimale de certaines protéines membranaires intégrales comme la bactériorhodopsine (Pomerleau et al., 1995). D'autres lipides comme les gangliosides peuvent jouer un rôle de récepteur membranaire spécifique ou encore être responsables d'adhésion cellulaire (Laitinen et al., 1987). Un grand nombre de lipides sont

Membranes	Principales protéines (P)	L/P (p/p)	Principaux lipides (L)
Myéline	Protéines basiques Lipophile	3-4	PC 10% PE 20% PS 8.5% SM 8.5% Ganglioside 26% Cholestérol 27%
Membrane discale (bovins)	Rhodopsine	1	PC 41% PE 39% PS 13% Cholestérol, trace
Membrane du récepteur cholinergique	Na/K-ATPase	0.5-0.7	PC 24% PE 23% PS 9.6% Cholestérol 40%
Réticulum sarcoplasmique	Ca-ATPase	0.66-0.7	PC 66% PE 12.6% PI 8.1% Cholestérol 10%
E. coli, membrane interne		0.4	PE 74% PG 19% CL 3%
Membrane pourpre	Bactériorhodopsine	0.2	Phosphatidylglycérophosphate 52% Glycolipides 30% Lipides neutres 6%

Tableau 1 Composition de quelques membranes cellulaires (Gennis, 1989).

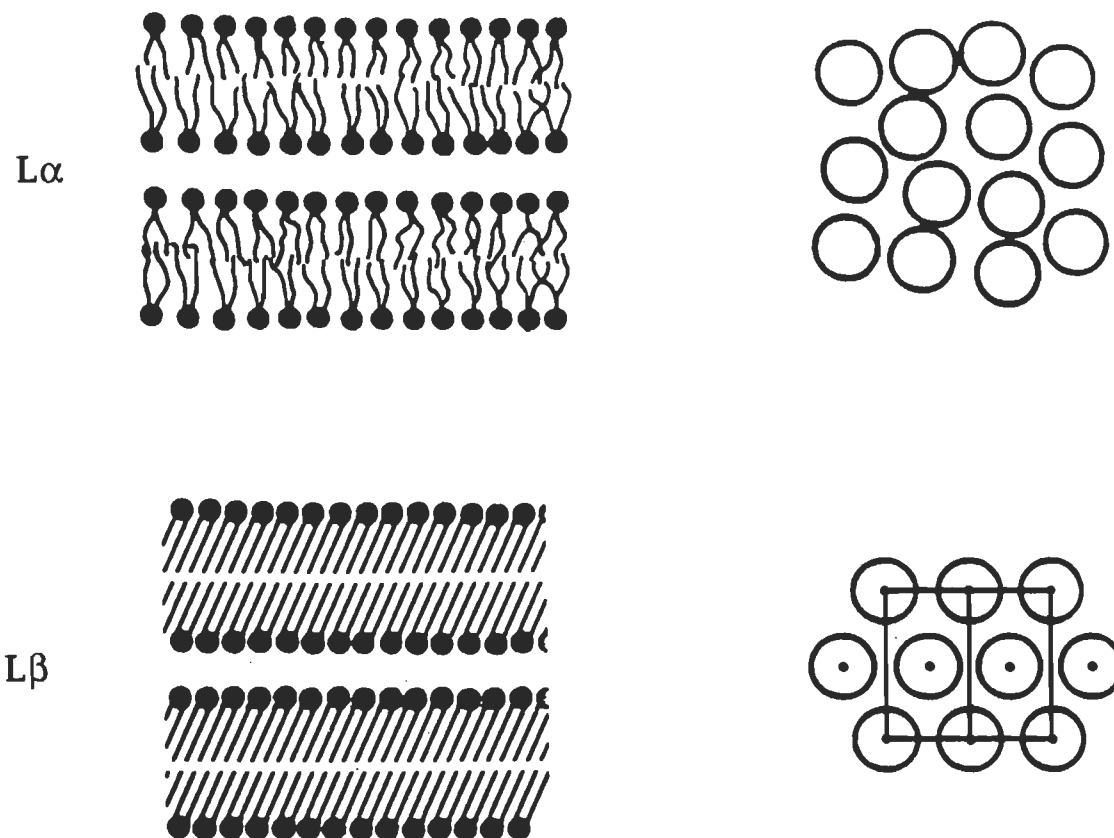


Figure 3. Organisation des phospholipides dans les phases lamellaires $L\alpha$ et $L\beta$ (Jain, 1988)

impliqués dans des voies de synthèse ou de régulation via l'action de phospholipases spécifiques (Berridge, 1987; Clark et al., 1995). À ces fonctions s'ajoutent des fonctions très spécifiques comme l'augmentation de la rigidité des membranes par le cholestérol (Gennis, 1989).

Dans les membranes, la quantité relative de protéines par rapport aux lipides varie fortement d'une membrane à l'autre. Par exemple, la membrane pourpre de la bactérie *Halobacterium halobium* est composée à 80% de protéines en poids sec alors que la membrane de myéline n'en contient que 20% (tableau 1). Les protéines sont en grande partie responsables des fonctions spécifiques des membranes et les différents modes d'interaction de celles-ci avec la matrice lipidique définissent deux types (Lehninger, 1982) de protéines membranaires (voir figure 4). Les protéines périphériques sont le premier type de protéines membranaires. De façon générale, les protéines de ce type sont liées aux membranes par des interactions électrostatiques avec la partie polaire des lipides ou d'autres protéines membranaires. Les protéines périphériques peuvent aussi interagir partiellement avec la région hydrophobe de la membrane. Les protéines intégrales se caractérisent par leurs fortes interactions avec la membrane. Ces protéines font partie intégrale de la membrane et elles sont très difficiles à séparer de la matrice lipidique sans l'aide de détergents (Helenius et Simons, 1975). Cette propriété est reliée à l'interaction entre les résidus hydrophobes de la protéine et la partie hydrophobe de la membrane. Les protéines membranaires intégrales sont souvent transmembranaires, en ce sens qu'elles traversent complètement la bicouche lipidique (Paul et Rosenbusch, 1985). Le ou les segments protéiques transmembranaires sont alors souvent composés de résidus hydrophobes organisés en hélice alpha.

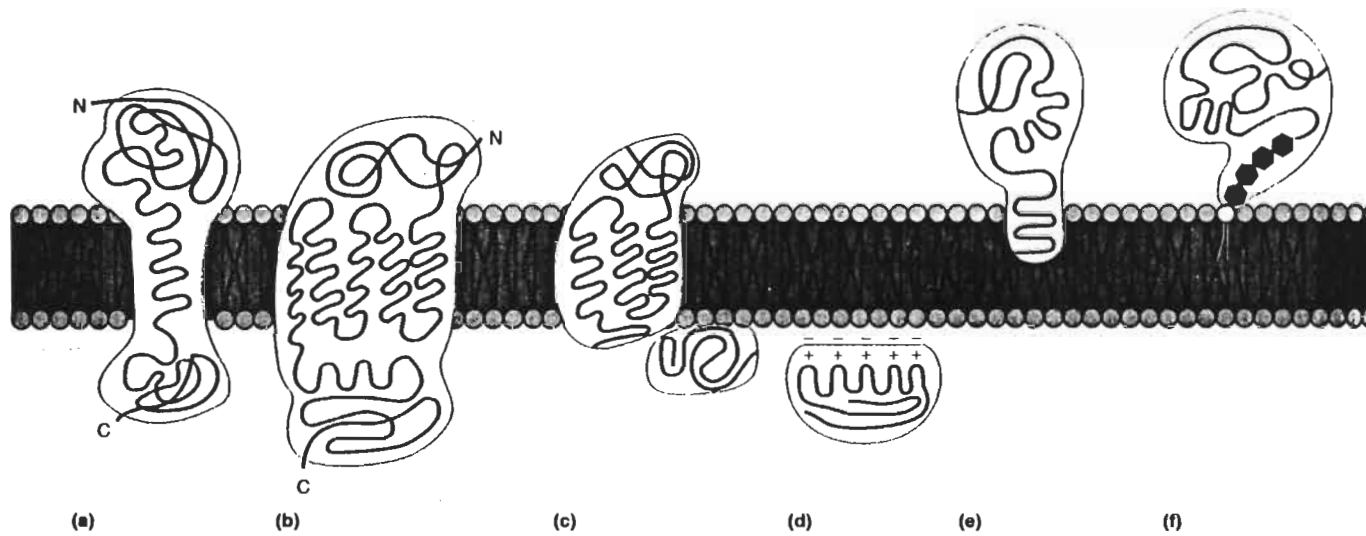


Figure 4 Types de protéines membranaires: (a) et (b) protéines membranaires, (c), (d), (e) et (f) protéines périphériques (Devlin, 1993).

1.2. Les phospholipases

Les phospholipases sont des enzymes responsables de la dégradation des phospholipides des membranes lipidiques. Ces enzymes sont caractérisées par une importante activation interfaciale. En effet, la vitesse d'hydrolyse peut être jusqu'à 1000 fois plus importante dans le cas de substrats organisés par rapport à une solution de monomères de lipides (Dennis, 1983; Cornell et Arnold, 1996). Les lipides peuvent être organisés principalement sous forme de micelles, de bicouches ou de monocouches à l'interface air-eau (Marsh, 1990). En principe, tous les liens ester d'un glycérophospholipide sont susceptibles d'être brisés par une réaction enzymatique (Van den Bosch, 1980). La figure 5 montre la position du lien chimique impliqué dans l'action des différentes phospholipases. Les phospholipases comprennent la phospholipase A1 (PLA1), la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase C (PLC) et la phospholipase D (PLD). Il existe principalement deux grandes familles de phospholipases: les phospholipases sécrétées et cytosoliques qui ont chacune des fonctions cellulaires très différentes (Dennis, 1983). Le rôle des phospholipases sécrétées qui proviennent de venins d'insectes et de reptiles ou encore qui sont présentes au niveau de l'appareil digestif, est de dégrader les membranes cellulaires. Pour cette raison, les enzymes de ce type ont une action non spécifique sur les différents phospholipides membranaires. Les enzymes de type cytosolique sont généralement beaucoup plus spécifiques en regard de certains phospholipides. Par exemple, il existe une PLC spécifique au phosphatidylinositol (Berridge, 1987) et une PLA2 qui hydrolyse des phospholipides contenant une chaîne arachidonique (Clark et al., 1995). Ces lipases sont donc impliquées dans des processus cellulaires beaucoup plus complexes.

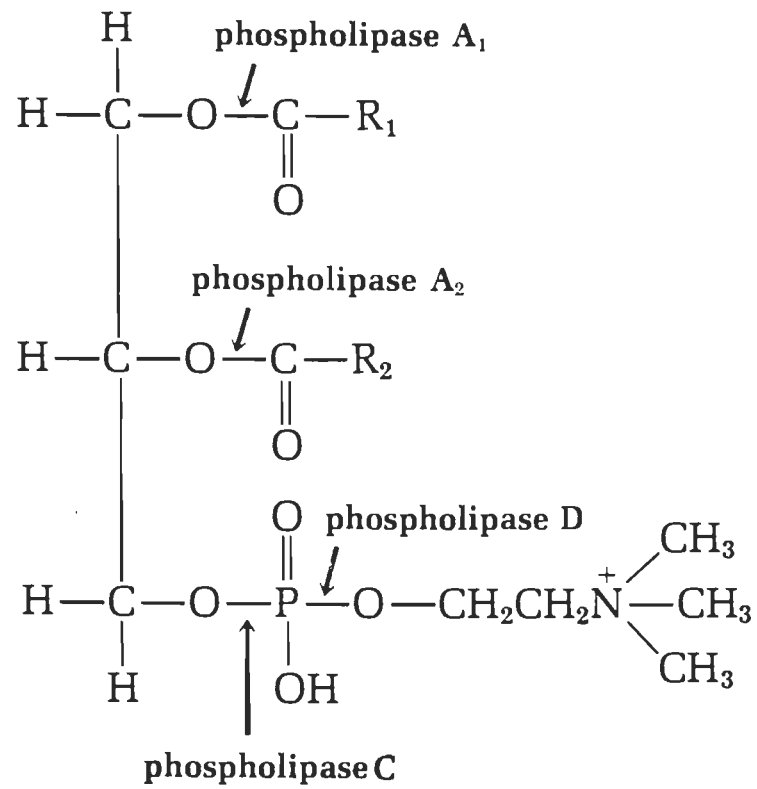


Figure 5 Position du lien chimique impliqué dans l'action des différentes phospholipases (Lehninger, 1982).

1.2.1 La phospholipase A2 (PLA2)

1.2.1.1 Fonction et types de PLA2

Les PLA2 sont généralement connues comme étant des enzymes responsables du catabolisme des phospholipides à l'échelle cellulaire et au cours de la transformation alimentaire dans le tube digestif (Van Den Bosch, 1980; Verheij et al., 1981; Zhou et Shulten, 1996). Les PLA2 sont aussi très bien connues pour le caractère toxique qu'elles donnent au venin de certains insectes et reptiles (Dennis, 1983). Ces différentes PLA2 (type I) ont un poids moléculaire se situant généralement entre 13 et 18 kD (Murakami et al., 1995). Plus récemment, certaines PLA2 ont été identifiées comme étant spécifiquement impliquées dans des processus biologiques importants comme ceux de la mémorisation et dans plusieurs pathologies comme les réactions inflammatoires liées à l'arthrite rhumatoïde (Clark et al., 1995). La relation entre les réactions inflammatoires et la PLA2 provient du fait qu'un des produits de son activité hydrolytique sur les phospholipides, l'acide arachidonique, est un précurseur des prostacyclines, tromboxanes et leucotriènes qui sont responsables de l'arthrite. Les PLA2 de type cytosolique (type II) ont un poids moléculaire beaucoup plus élevé (85 kD) que les PLA2 sécrétées.

1.2.1.2 Mécanisme d'hydrolyse de phospholipides par la PLA2

La PLA2 est responsable de l'hydrolyse stéréospécifique du lien acyl-ester en position C2 des glycérophospholipides. La figure 6 montre l'hydrolyse de la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Comme pour la

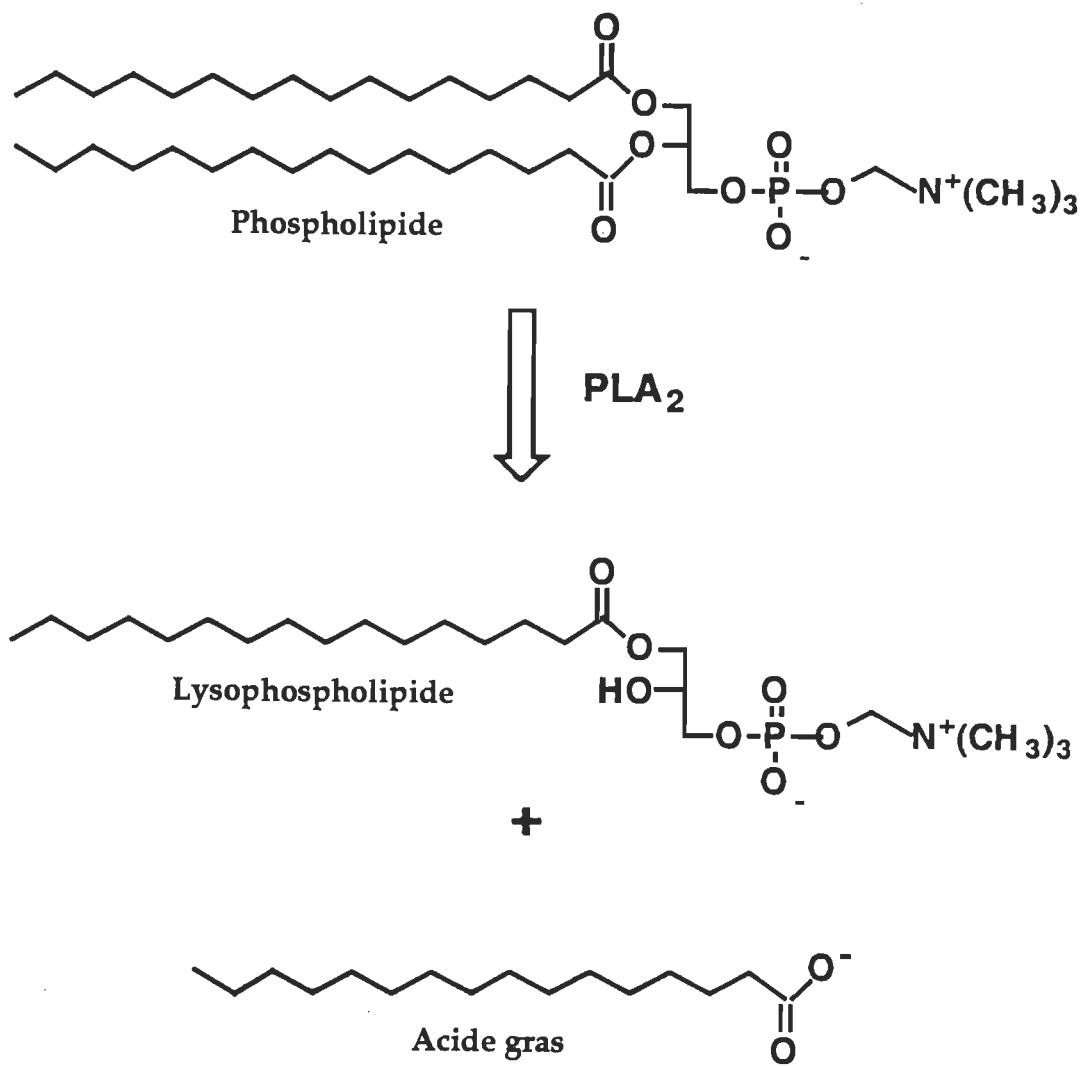


Figure 6 Hydrolyse du DPPC par la PLA2.

plupart des lipases, l'activité de la PLA2 est beaucoup élevée en présence de substrat phospholipidique organisé. Cette hydrolyse produit un acide gras et un lysophospholipide. Le mécanisme d'hydrolyse de phospholipides par la PLA2 a été presque exclusivement étudié en utilisant celles provenant du venin de divers insectes et reptiles ainsi que celle du pancréas. Ce mécanisme peut être divisé en deux étapes distinctes (Jain et Berg, 1989). Dans un premier temps, l'enzyme se lie plus ou moins fortement à la membrane, lie ensuite un phospholipide et l'hydrolyse. Cette première étape de l'hydrolyse définit deux modes d'hydrolyse: dans le mode "scooting", l'enzyme demeure à l'interface jusqu'à ce que le film lipidique soit complètement hydrolysé alors que dans le mode "hopping", l'enzyme se désorbe à chaque cycle catalytique. L'occurrence de ces différents modes dépend de la force de la liaison entre l'enzyme et le substrat et celle-ci dépend de la nature de la tête polaire des phospholipides ainsi que du type d'enzyme. Par exemple, le groupe de Jain et al. (1986) a montré que la PLA2 pancréatique a plus d'affinité pour une membrane composée de phospholipides possédant une tête polaire chargée négativement (e.g. phosphatidylsérine) que pour des phospholipides zwitterioniques (e.g. phosphatidylcholine). Cependant, ils ont aussi observé que la liaison de PLA2 provenant de divers venins était moins sensible à la différence de charge de la tête polaire. Par ailleurs, il a été montré que l'activité de la PLA2 augmentait de façon significative lors de la transition de phase gel-liquide cristallin (Van Hoogevest et al., 1984; Vernon et Bell, 1992; Burack et Biltonen, 1994). Les auteurs de ces études ont proposé que la présence de défauts dans les microdomaines de phospholipides à l'état solide était responsable de cette activation.

Dans une étude par diffraction des rayons X du mécanisme d'hydrolyse (Scott et al. 1990) réalisée à partir de PLA2 de venin d'abeille cristallisée en présence et en absence de substrat, il a été montré que ce type de PLA2 présentait une structure rigide à 7 ponts disulfure qui ne subit aucun changement conformationnel important pendant l'hydrolyse. De plus, cette étude a montré que le site d'hydrolyse de la PLA2 est situé dans une cavité hydrophobe (voir figures 7 et 8) localisée au niveau de la surface de liaison de l'enzyme au film lipidique. L'hydrolyse impliquerait, dans un premier temps, l'extraction partielle des phospholipides de la membrane par cette cavité hydrophobe (voir figure 8). La grande étanchéité de ce tunnel par rapport à la phase aqueuse permettrait un transfert déshydraté et isoénergétique du substrat. Dans le présent travail, le mécanisme d'hydrolyse ainsi que le comportement général de la PLA2 en présence de monocouches de phospholipides à l'interface air-eau a été étudié. Le système des monocouches ainsi que les objectifs seront décrits plus loin.

1.2.2 La phospholipase C (PLC)

1.2.2.1 Fonction et types de PLC

Dans le présent travail, nous avons aussi étudié le mode d'action de la PLC sur des monocouches de phospholipides. Comme pour la PLA2, il existe aussi plusieurs types de PLC. Les plus intéressants d'entre eux, d'un point de vue métabolique, sont les phospholipases C spécifiques aux phosphatidylinositols (Berridge, 1987). Ces PLC sont de type cytosolique et elles sont généralement activées par une protéine-G. Les deux produits

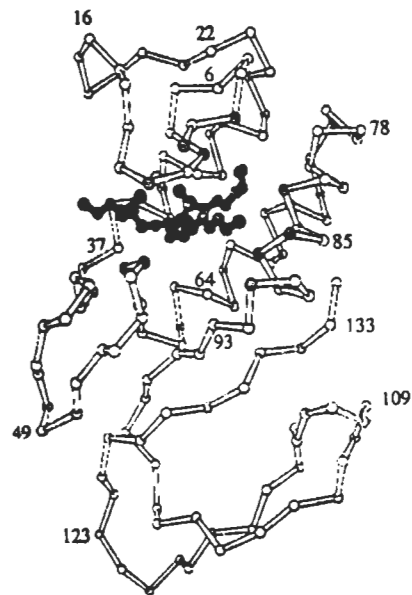


Figure 7 Structure de la PLA2 de venin d'abeille montrant un phospholipides (atome en noir) dans le site de liaison (Scott et al. 1990).

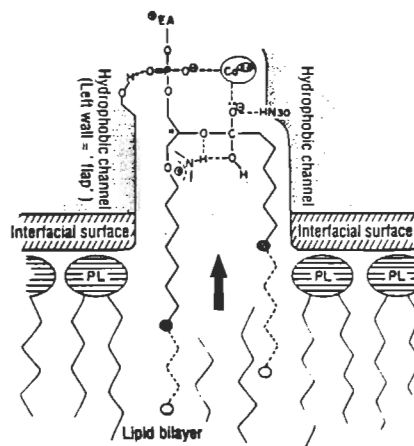


Figure 8 Schéma du site de liaison et du site d'hydrolyse de la PLA2 (Scott et al. 1990).

l'hydrolyse (le diacylglycérol et l'inositol phosphate) agissent alors comme messagers intracellulaires, l'un activant une protéine kinase C et l'autre en régulant la quantité de calcium intracellulaire. L'analyse du poids moléculaire des PLC spécifiques aux groupements inositol provenant de différentes sources cellulaires, montre qu'il existe quatre groupes différents dont les poids moléculaires varient entre 60 et 155 kD (Rhee et al., 1989). Le second type de PLC est présent dans les toxines de nombreuses bactéries comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus* (Van den Bosch, 1980). Ces enzymes sont souvent associées à des pathologies graves, notamment la gangrène causée par *Clostridium perfringens*. La spécificité des PLC sécrétées est très large par rapport au substrat et leurs poids moléculaires est beaucoup plus faible (≈ 20 kD).

1.2.2.2 Mécanisme d'hydrolyse de phospholipides par la PLC

La PLC est responsable de l'hydrolyse du lien phospho-ester (voir figure 5) au niveau de la tête polaire des phospholipides de la membrane. L'hydrolyse d'une phosphatidylcholine, par exemple, produit un diacylglycérol non soluble et une phosphocholine soluble (voir figure 9). Comme la PLA₂, la PLC possède une activité enzymatique beaucoup plus élevée en présence de substrats organisés comparativement aux monomères (Cornell et Arnold, 1996). De plus, la PLC a aussi une région hydrophobe près du site d'hydrolyse qui pourrait être impliquée dans la liaison de l'enzyme au film lipidique. Cependant, contrairement à la PLA₂, la PLC peut hydrolyser la tête polaire d'un phospholipide sans l'extraire de la membrane (Cornell et Arnold, 1996). En effet, le lien à hydrolyser est directement accessible à la surface de la membrane.

De plus, le site d'hydrolyse de la PLC n'est pas particulièrement hydrophobe en comparaison à celui de la PLA2 (Cornell et Arnold, 1996). La PLC est très sensible à l'état physique des phospholipides (Rao et Sundaram, 1993). En effet, les états physiques pour lesquels la tête polaire est accessible et libre (état liquide cristallin) favorisent l'activité de l'enzyme par rapport aux états très compacts (états gels). De plus, la courbure négative (figure 10) d'une membrane serait responsable d'une faible activité de l'enzyme alors qu'une courbure positive favoriserait son activité à cause de la plus grande accessibilité de la tête polaire dans ce cas (Cornell et Arnold, 1996). La PLC est aussi sensible à la charge nette de la tête polaire des phospholipides puisque l'incorporation de lipides chargés positivement ou négativement (El-Sayed et Roberts, 1985) à la membrane produit une augmentation de l'activité de l'enzyme.

1.3 Synergie mélittine-PLA2

1.3.1 Structure de la mélittine

La mélittine est un polypeptide de 26 acides aminés constituant, dans une proportion importante, le venin d'abeille (pour une revue récente, voir Dempsey, 1990). Ce polypeptide s'adsorbe spontanément aux membranes biologiques ou aux bicouches modèles et induit des perturbations importantes de la structure lipidique (Benachir et Lafleur, 1995; Faucon et al., 1995). À concentration très élevée (1 mélittine pour 5 lipides), la mélittine agit comme un détergent et détruit complètement l'organisation de la bicouche (Dufourcq et al., 1986), alors qu'à faible concentration, elle forme des canaux ioniques voltage dépendant dans certaines membranes lipidiques (Tosteson et al., 1987).

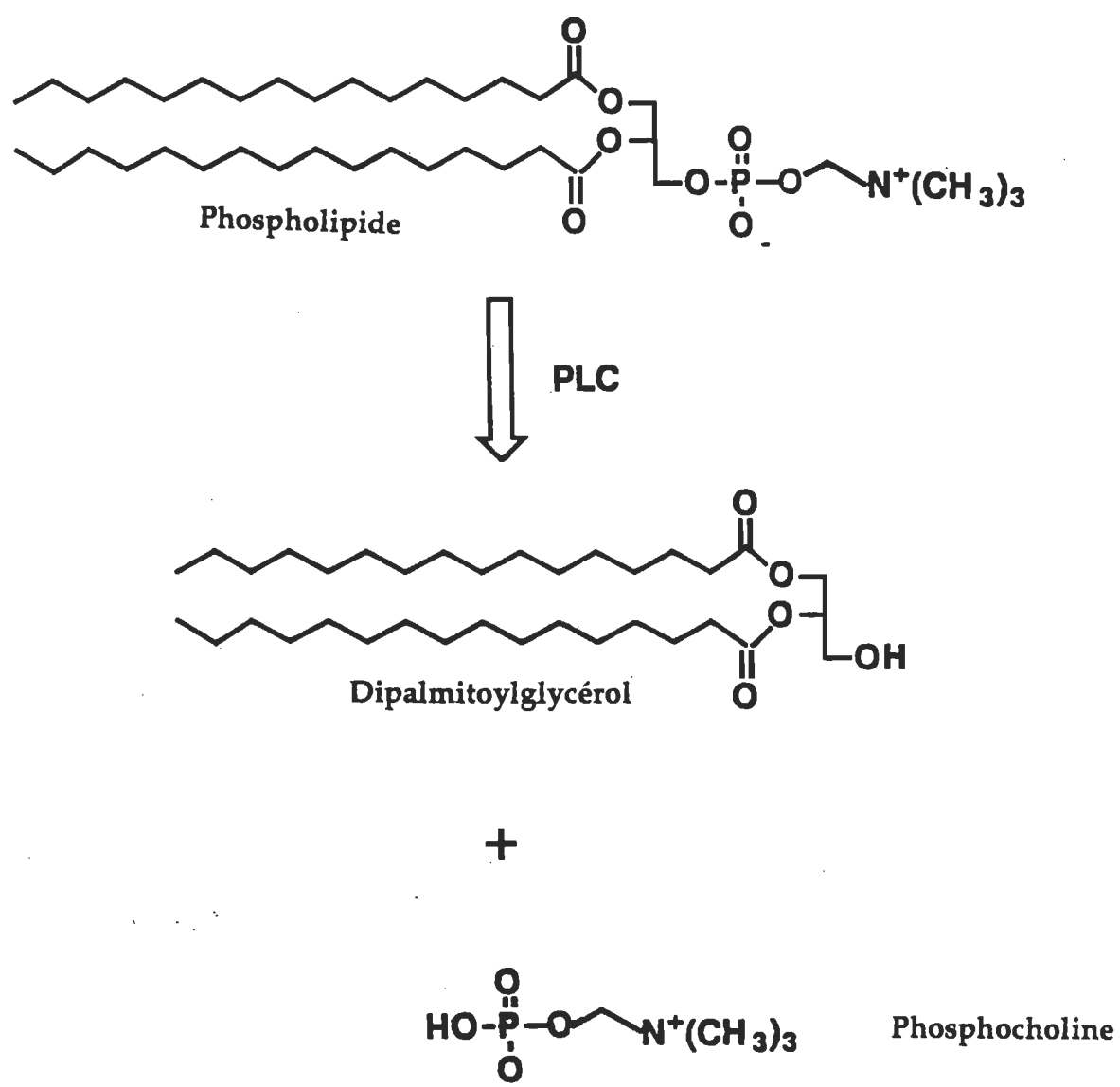


Figure 9 Hydrolyse du DPPC par la PLC.

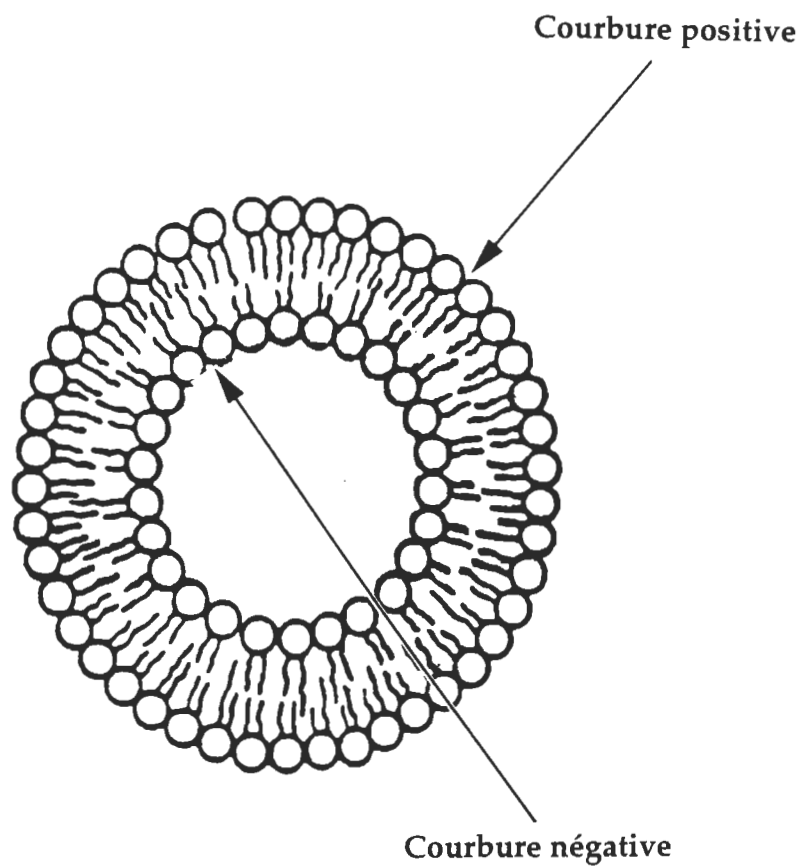


Figure 10 Courbure négative et positive d'une membrane.

La mélittine est aussi susceptible de provoquer des séparations de phases lipidiques (Lafleur et al., 1989), de la fusion membranaire (Bradick et al., 1987) ainsi que l'agrégation de protéines membranaires intégrales (Clague et Cherry, 1988). La mélittine existe sous forme de monomère sans aucune structure secondaire lorsqu'elle se retrouve en solution aqueuse diluée. Cependant, des conditions particulières du milieu aqueux peuvent provoquer la tétramérisation de la mélittine. Ces tétramères sont constitués de monomères organisés en hélice alpha (Dempsey, 1990). Les propriétés conformationnelles et d'agrégation de la mélittine sont dues à deux forces opposées. La force hydrophobe, qui agit de façon à emprisonner les résidus non polaires dans des cavités où l'eau est absente, provoquent l'association du peptide en tétramère alors que la force électrostatique entre les résidus chargés s'oppose à la formation de ceux-ci. Ainsi, les facteurs qui diminuent la densité effective de charge sur le peptide (concentration de sel élevée, pH alcalin) sont susceptibles de provoquer l'association des monomères de mélittine. Ces observations sont en parfait accord avec la nature très amphiphile de la mélittine tel que démontré par la structure à 2 Å obtenue par diffraction des rayons X (Terwilliger et al., 1982). Cette structure (figure 11) montre une hélice alpha courbée de 26 acides aminés (proline à la position 14) où les résidus hydrophobes se retrouvent sur un côté de l'axe de l'hélice alors que les résidus hydrophiles composés, entre autres, de 6 lysines chargées positivement, se retrouvent de l'autre côté. C'est précisément cette nature amphiphile de la mélittine qui est responsable de sa liaison à la membrane. La figure 12 montre schématiquement la liaison du peptide avec la membrane. Dans ce schéma, le côté hydrophobe de l'hélice interagit avec les chaînes grasses des lipides alors que le côté polaire se retrouve au niveau des têtes polaires des phospholipides (Demsey, 1990; Frey et Tamm, 1991).

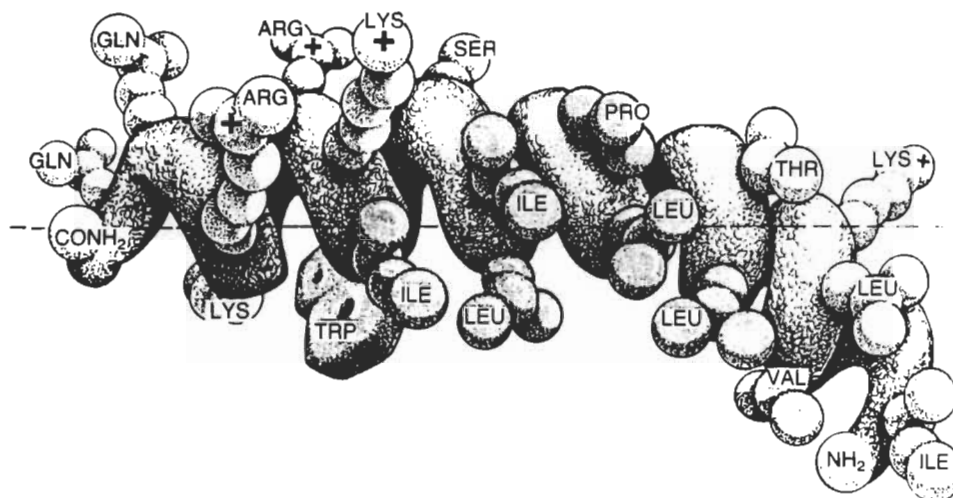


Figure 11 Structure de la mélittine (Terwilliger et al., 1982).

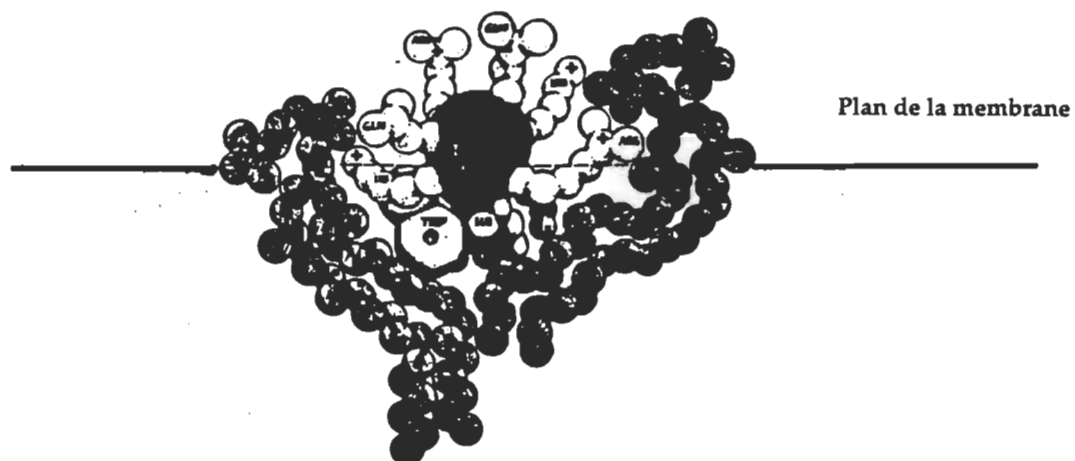


Figure 12 Schéma de la liaison de la mélittine à une membrane lipidique. Les atomes en noir représentent des phospholipides de la membrane (Terwilliger et al., 1982).

1.3.2 Nature du synergisme.

La PLA2 et la mélittine sont les deux constituants majeurs de plusieurs venins, dont le venin d'abeille. La mélittine consiste à elle seule jusqu'à 50% du poids sec du venin alors que la PLA2 ne représente que 5%. Ces deux composantes du venin montrent un synergisme marqué dans leur action sur les membranes (Mollay et Kreil, 1974). Dans cette étude, les auteurs montrent une activité phospholipasique sur des vésicules de phosphatidylcholine 5 fois plus élevée en présence qu'en absence de mélittine. De plus, il a été noté qu'un très faible ratio (1:2500) mélittine:lipides pouvait produire une activation de la PLA2. Très peu de choses sont connues sur le mécanisme de cet effet synergique. En effet, on ne sait pas si la mélittine interagit directement avec la PLA2 ou via le substrat lipidique. Il a été proposé que la présence de charges sur le peptide augmente l'affinité de la PLA2 pour l'interface lipidique (Conricode et Ochs, 1989). Cette augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le film lipidique aurait pour effet d'augmenter la concentration de l'enzyme à l'interface et donc d'augmenter globalement la vitesse d'hydrolyse du substrat lipidique organisé. Le mode d'hydrolyse par "scooting" serait donc favorisé par rapport au mode "hopping". À ce jour, aucune étude directe n'a été réalisée pour démontrer l'importance des charges positives de la mélittine dans le processus d'activation de la PLA2.

1.4 Problématique de la recherche

1.4.1 Organisation et composition des domaines de PLA2

Il a été montré, par microscopie à épifluorescence, que la PLA2 attaque et hydrolyse de façon spécifique les domaines solides de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) dans la transition de phase en monocouche (voir figure 13). L'hydrolyse de cette monocouche entraîne la formation de domaines de PLA2 à l'interface air-eau (Grainger et al., 1989 et 1990). Par la suite, il a été proposé par Reichert et al. (1992) que les deux produits d'hydrolyse, i.e. l'acide palmitique et le lyso-PC, pouvaient être nécessaires à la formation de ces domaines. Il est cependant impossible de dire, à partir de ces études, l'importance de chacun des produits d'hydrolyse et des différents sels présents (NaCl et CaCl₂) dans la sous-phase lors de la formation des domaines de PLA2. De plus, on ne connaît rien de l'organisation de la PLA2 dans ces domaines. En effet, la PLA2 peut être organisée de façon désordonnée ou sous la forme d'un cristal bi-dimensionnel. La formation de ces domaines est très importante car elle pourrait correspondre à un mécanisme d'auto-inhibition de l'hydrolyse. Un des objectifs de ce travail est donc de déterminer l'importance des produits d'hydrolyse et l'organisation de la PLA2 dans les domaines de PLA2 à l'interface air-eau.

Pour répondre à la question de l'importance des produits d'hydrolyse dans la formation des domaines de PLA2, deux phospholipides asymétriques ont été utilisés. Ces deux phospholipides produisent chacun à la fin de leur hydrolyse des monocouches d'acide gras ou de lysophosphatidylcholine pures du à la solubilisation d'un de ces deux produits dans la sous-phase. Des mesures de variation d'aire moléculaire et de potentiel de surface ainsi

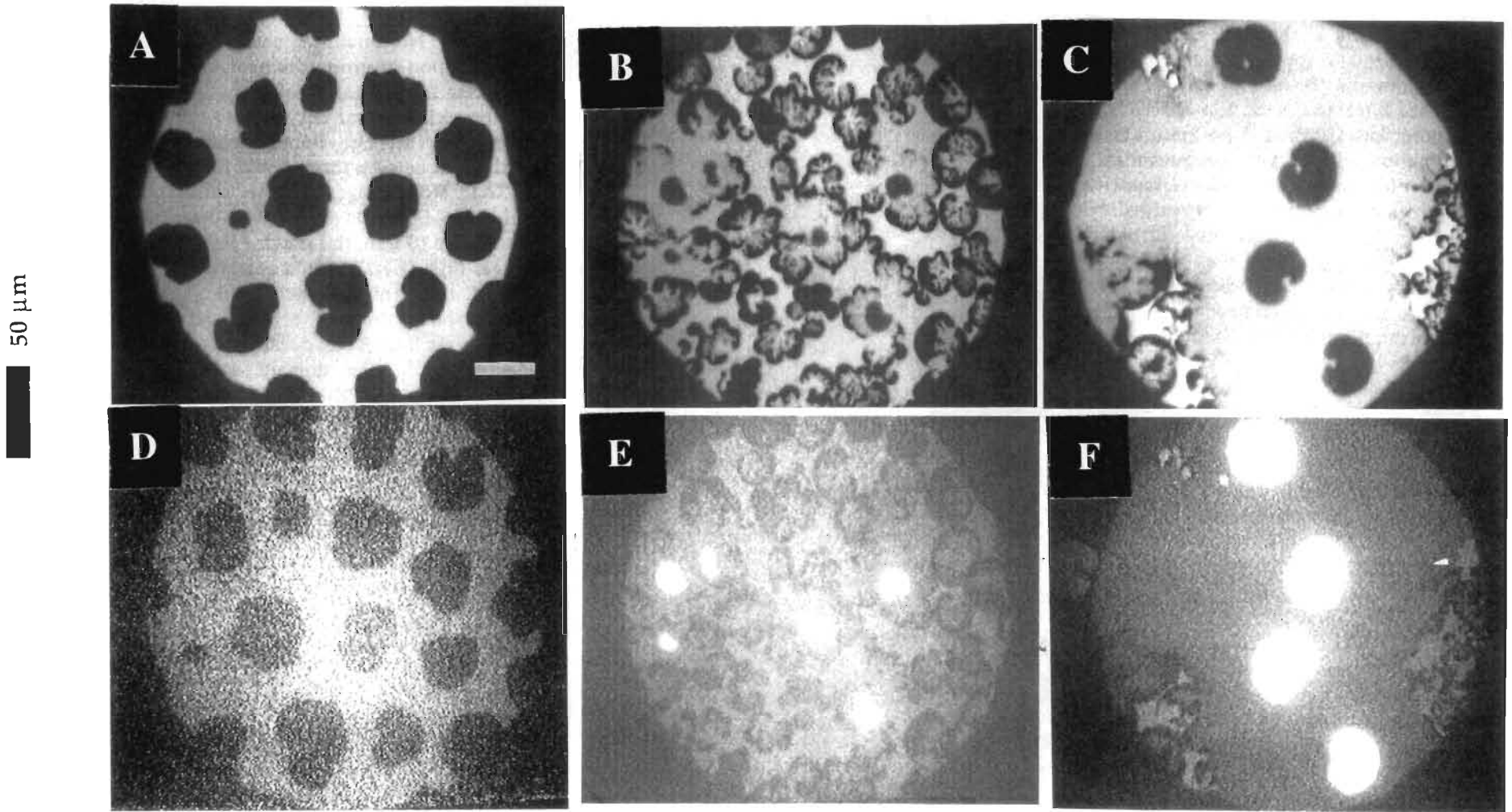


Figure 13 Micrographies de l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC dans la transition de phase LE/LC à 22 mN/m et 30°C. Les images A-C sont obtenues à partir de la fluorescence d'un lipide marqué avec une rhodamine alors que les images D-F proviennent de la fluorescence de la PLA2 marquée avec la fluorescéine. Les paires d'images A-D, B-E et C-F ont été prises à 0, 25 et 60 min, après l'injection de la PLA2, respectivement (Grainger et al., 1989).

que la visualisation par microscopie à épifluorescence de l'hydrolyse de ces phospholipides asymétriques seront réalisés dans le but de démontrer l'importance des acides gras et des lysophospholipides dans la formation des domaines de PLA2 observés par Grainger et al. (1989 et 1990). De plus, des mesures de spectres infrarouges à l'interface air-eau de l'hydrolyse de monocouches de DPPC ont été faites afin de montrer, dans un premier temps, l'apparition des différents produits d'hydrolyse à l'interface. Les spectres infrarouges obtenus lors de l'hydrolyse des différents phospholipides asymétriques seront ensuite mesurés pour observer la disparition ou l'apparition des différentes composantes de la monocouche suite à l'hydrolyse par la PLA2. Les spectres ont été réalisés à l'aide d'une nouvelle technique appelée spectroscopie infrarouge de réflectivité différentielle par modulation de polarisation (PM-IRRAS). L'analyse des différents spectres infrarouges permettra de montrer l'importance du calcium dans le mécanisme de formation de domaines d'acide gras suite à l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC. La technique PM-IRRAS a aussi été utilisée afin de démontrer la présence et l'organisation de la PLA2 dans les domaines d'enzymes formés suite à l'hydrolyse de monocouches phospholipidiques. Enfin, des spectres PM-IRRAS enregistrés lors de l'hydrolyse de monocouches de phospholipides par la PLC ont été mesurés afin de démontrer le potentiel de cette technique dans l'étude de l'action d'autres enzymes lipolytiques sur des monocouches de phospholipides.

1.4.2 Nature de l'effet synergique entre la PLA2 et la mélittine

Le second objectif de ce travail est d'étudier la nature de l'effet synergique entre la PLA2 et la mélittine. Dans un premier temps, nous utiliserons deux analogues de la mélittine, portant différentes quantités de charges positives, afin de déterminer l'importance des charges positives de la mélittine dans l'activation de la PLA2. Il s'agit de deux peptides composés simplement de leucines (L) et de lysines (K). Les résidus leucine et lysine sont distribués de façon à ce que le peptide forme une hélice alpha amphiphile idéale semblable à la mélittine. Nous utiliserons ensuite ces peptides marqués avec un dansyl afin d'étudier, par microscopie à épifluorescence, les perturbations induites par le peptide sur une monocouche de DPPC dans la transition de phase LC/LE.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Système modèle des monocouches: généralités.

Les premières études de films monomoléculaires de surfactants ont été réalisées au tout début de la science moderne. Les premières expériences qui datent d'aussi loin que 1774 traitaient des propriétés tensioactives de films d'huile à la surface de l'eau. Langmuir fut le premier à étudier de façon systématique le comportement de molécules insolubles à l'aide d'une cuve permettant la mesure simultanée de l'aire moléculaire et de la tension superficielle de films lipidiques à l'interface air-eau. Il est très intéressant de noter que la première indication de la nature lipidique des membranes biologiques a été obtenue par l'utilisation de films monomoléculaires à l'interface air-eau. En effet, Gorter et Grendel (1925) ont comparé la surface calculée de membranes d'érythrocytes avec l'aire obtenue par l'étalement des lipides extraits de ces membranes à la surface de l'eau. De cette étude, les auteurs ont conclu que les phospholipides des membranes des érythrocytes étaient organisés sous forme de bicouche lipidique. Nous savons maintenant que l'erreur liée à ces expériences provenait du fait que les auteurs ne considéraient pas les protéines présentes dans la structure des membranes biologiques. La technique des monocouches est aujourd'hui largement utilisée dans la caractérisation de matériel biologique.

2.1.1 La technique des monocouches

Dans le présent travail, le système modèle des monocouches a été utilisé afin de caractériser l'activité d'enzymes lipolytiques sur des phospholipides. Cette technique permet de contrôler facilement plusieurs paramètres physico-chimiques des phospholipides comme la densité de surface (aire moléculaire), la pression de surface, la température et la composition de la sous-phase de la monocouche. De façon plus spécifique, les variations de l'aire moléculaire, de la pression de surface et du potentiel de surface ainsi que des mesures de microscopie à épifluorescence et de spectroscopie infrarouge (PM-IRRAS) ont été utilisées pour caractériser l'activité de phospholipases à l'interface air-eau. Ces différentes méthodes seront décrites plus loin dans ce chapitre. La mesure des isothermes de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire est sans aucun doute la façon la plus simple de caractériser un film lipidique à l'interface air-eau et cette isotherme est mesurée à l'aide d'une cuve qui permet la mesure simultanée de l'aire moléculaire et de la pression de surface. La figure 14 illustre une cuve de Langmuir typique utilisée dans ce travail. Nous ferons ici une description très brève d'une cuve de Langmuir puisque celle-ci a déjà fait l'objet de nombreux ouvrages et thèses (Gaines, 1966; Lamarche, 1988). La cuve est faite essentiellement de téflon machiné selon les dimensions requises par le type de mesure. Dans certains cas, le fond de la cuve est composé d'un bloc d'aluminium thermostaté recouvert de téflon autoadhésif pour permettre un contrôle efficace de la température de la sous-phase. La barrière mobile de téflon permet de varier l'aire moléculaire et le déplacement de celle-ci est réalisé grâce à un moteur à pas contrôlé par ordinateur. La pression de surface est mesurée à l'aide d'un transducteur linéaire de déplacement par la méthode de Whilhelmy en remplaçant la traditionnelle plaque de platine par

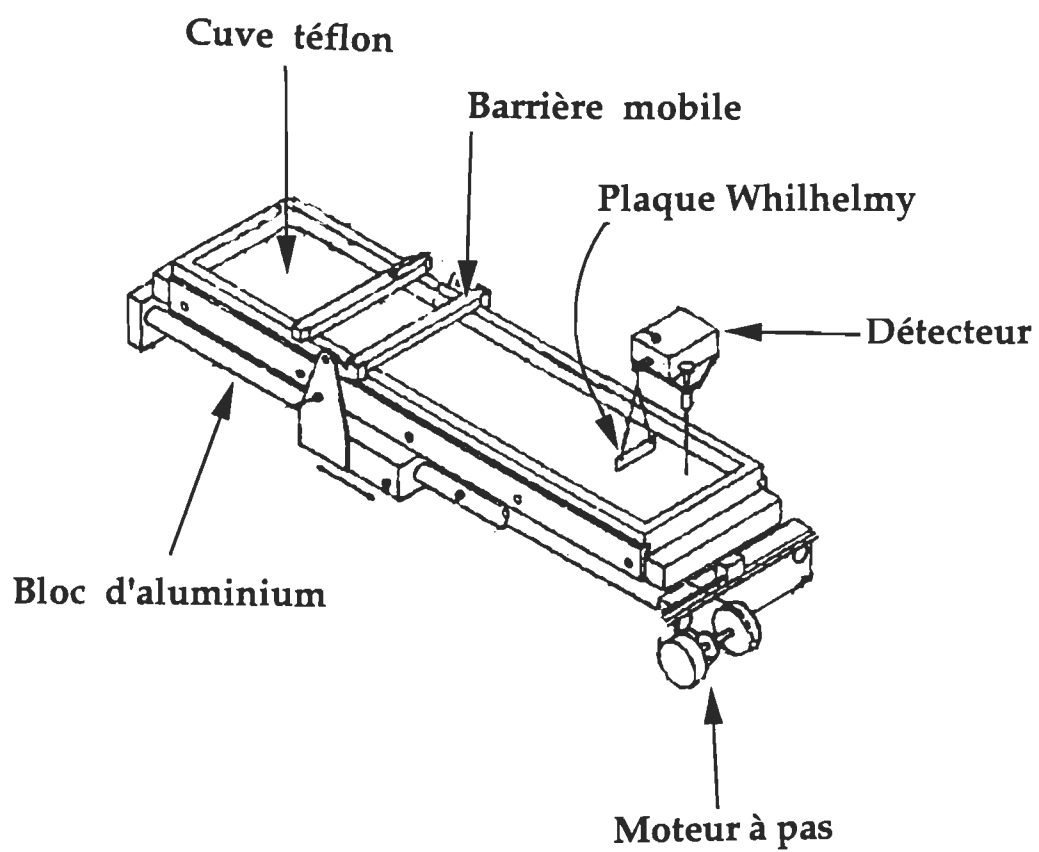


Figure 14 Schéma d'une cuve de Langmuir typique.

un morceau de papier filtre. L'utilisation du papier filtre élimine les problèmes de mouillage présents dans le cas de la plaque de platine et les problèmes de contamination puisqu'il est très facile à changer. Le transducteur est calibré avec l'isotherme de l'acide arachidique sur l'eau pure qui est bien connu pour sa transition de phase à 25,7 mN/m à 20 °C (voir figure 15a). L'asservissement de la cuve de Langmuir par un ordinateur permet de réaliser facilement des expériences à aire ou à pression constante.

2.1.2 L'aire moléculaire

L'aire moléculaire correspond à l'aire occupée par chaque molécule à l'interface et celle-ci est directement reliée au degré d'entassement de la monocouche. On obtient l'aire moléculaire en divisant l'aire du bain en Angström² (Å²) par le nombre de molécules présentes à la surface de la cuve de Langmuir. Ainsi, la valeur de l'aire moléculaire est directement liée à la position de la barrière mobile puisque celle-ci détermine l'aire de la cuve. L'incertitude sur cette mesure est directement liée à la précision de la mesure du volume de la solution lipidique à étaler. Il est possible de reproduire un isotherme à l'intérieur de 1 Å²/molécule d'erreur. Par exemple, il est impossible de comprimer une monocouche d'acide gras en dessous de la valeur minimale de l'aire moléculaire (Gaines, 1966) qui est d'environ 20 Å²/molécule (voir l'isotherme à la figure 15a). Ceci est dû au fait que l'aire moléculaire minimale observée pour une monocouche d'acide gras ne peut être inférieure à l'aire de la section transversale (≈ 20 Å²/molécule, Gennis, 1989) d'une chaîne d'acide gras (voir figure 15b). L'aire moléculaire d'une monocouche est directement liée à la pression de surface et l'isotherme de

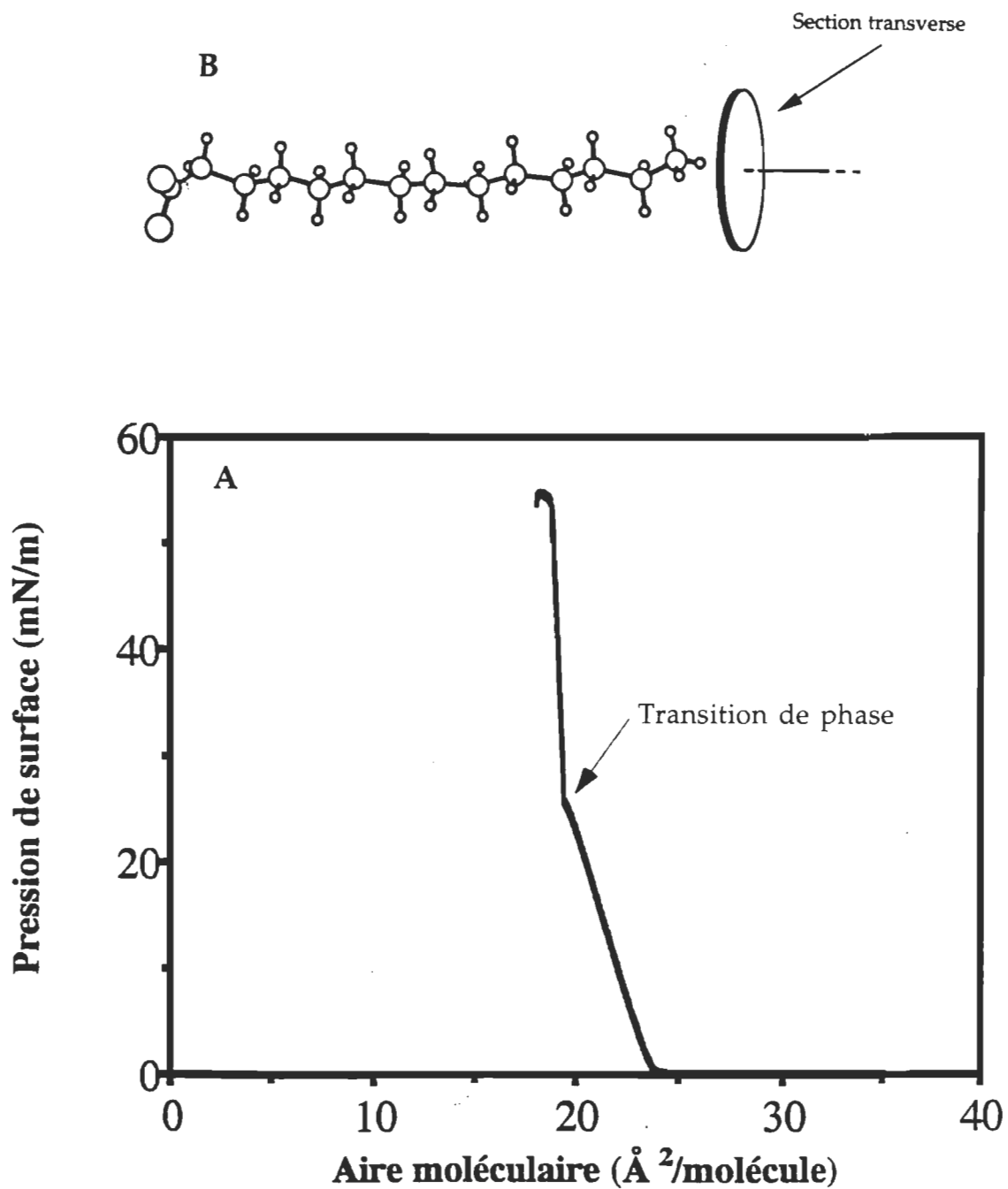


Figure 15 (a) Isotherme de l'acide arachidique sur l'eau (Méthot, 1996).
(b) Section transverse d'une chaîne d'acide gras (Gennis, 1989).

pression de surface permet de décrire la relation existant entre ces deux paramètres.

2.1.3 La pression de surface

La pression de surface correspond à la différence entre la tension superficielle de l'eau et la tension de l'eau recouverte d'une couche de molécules tensioactives. Cette différence correspond en fait au changement d'énergie libre de la surface suite à l'organisation d'une couche moléculaire. La pression de surface est donnée par la relation suivante (Gaines, 1966),

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{mN/m}) \quad (1)$$

où Π est la pression de surface, γ_0 la tension superficielle de l'eau et γ la tension superficielle de l'eau recouverte d'une monocouche lipidique. Les molécules constituant une monocouche sont caractérisées par leur très forte nature amphiphile. Ces molécules sont, en effet, constituées d'une portion hydrophile qui se retrouve en contact direct avec l'eau et d'une portion hydrophobe en contact avec l'air. Dans le cas des phospholipides membranaires, la portion hydrophile est associée au groupement glycérophosphate (figure 2) alors que la partie hydrophobe est composée des deux chaînes aliphatiques. C'est précisément la balance entre les interactions hydrophiles et hydrophobes d'un phospholipide à une aire moléculaire donnée qui déterminera son organisation à l'interface air-eau. Ainsi, tout facteur susceptible de changer l'organisation (donc l'énergie libre) de la monocouche aura un effet direct sur la valeur de pression de surface. La température, l'aire moléculaire, la nature

de la sous-phase, ainsi que l'action de protéines sont des exemples de ces facteurs. L'incertitude sur la mesure de pression de surface est d'environ 0.5 mN/m.

2.1.4 Le potentiel de surface

Le potentiel de surface correspond à la différence de potentiel existant de part et d'autre de l'interface air-eau. Cette différence de potentiel est d'abord causée par la présence de dipôles orientés à l'interface. Le dipôle de l'eau interfaciale est la composante majeure du potentiel de l'interface air-eau pure. Ce système est sans aucun doute le plus simple en ce qui concerne l'interprétation des mesures de potentiel de surface. La relation suivante décrit le potentiel de surface à cette interface air-eau (Gaines, 1966),

$$V = 12\pi \mu / A \quad (\text{mV}) \quad (2)$$

où V est le potentiel de surface, μ le moment dipolaire perpendiculaire à l'interface et A l'aire moléculaire. L'expression et l'interprétation du potentiel de surface se complexifie si on étale un phospholipide à l'interface air-eau. Dans ce cas, la valeur du potentiel de surface est attribuée au dipôle de l'eau ainsi qu'aux nombreux dipôles associés à la structure des phospholipides. Il est à noter que, dans ce cas, le dipôle associé à l'eau possède une valeur différente de celle d'une interface air-eau pure. Ceci est dû à la réorientation des molécules d'eau interagissant avec la tête polaire des phospholipides. Dans le cas d'une interface recouverte d'un film phospholipidique, le potentiel de surface, ΔV , est exprimé par la relation (3) où V est le potentiel mesuré en

présence du film lipidique et V_0 le potentiel de l'interface air-eau pure.

$$\Delta V = V - V_0 \quad (\text{mV}) \quad (3)$$

La présence d'ions dans la sous-phase peut changer de façon importante la valeur du potentiel de surface. Ceci est dû à la formation de la double couche diffuse d'ions près de l'interface (Israelachvili, 1985). La présence de charges positives ou négatives nettes au niveau de la partie polaire de phospholipides contribue de façon directe à la valeur du potentiel de surface. Dans ce cas, le terme ψ représentant le potentiel électrostatique doit être ajouté à l'expression du potentiel. La relation suivante tient compte de ce facteur:

$$V = (12\pi \mu / A) + \Psi \quad (\text{mV}) \quad (4)$$

Le potentiel de surface a été mesuré par la méthode d'ionisation de la couche d'air (Gaines, 1966). Ainsi, une électrode radioactive de ^{241}Am (Nuclear Radiation Development, Grand Island, NY) est placée à une distance variant entre un et deux millimètres au-dessus de la sous-phase. L'ionisation de l'air par l'électrode permet d'établir le contact entre celle-ci et la sous-phase. On mesure donc le potentiel entre l'électrode radioactive et une électrode de référence constituée d'une feuille de platine. Cette électrode de référence est plongée directement dans la sous-phase, derrière la barrière mobile. La mesure du potentiel de surface est très sensible à l'état d'hydratation de l'électrode radioactive. Ainsi, avant chaque série d'expériences, l'électrode est entreposée quelques jours au-dessus de la surface de l'eau. De plus, avant chaque expérience, on doit s'assurer que le potentiel de l'eau (potentiel de référence)

soit le plus stable possible, c'est-à-dire qu'il ne varie pas plus que ± 5 mV pendant une heure. Le potentiel de surface est aussi très sensible à toutes les interférences électriques présentes dans la pièce. En effet, le recouvrement de la cuve de Langmuir par une cage de Faraday fait passer la valeur du bruit sur la mesure de ± 30 mV à ± 5 mV. Cette cage de Faraday est simplement composée de feuilles de papier aluminium reliées à l'électrode de référence.

2.2 Mesure de l'hydrolyse des monocouches à pression constante

Les cinétiques d'hydrolyse des monocouches de phospholipides par la PLA2 ont été obtenues en mesurant la variation de l'aire moléculaire à pression de surface constante. Comme mentionné dans l'introduction (voir figure 6), l'hydrolyse d'un phospholipide par la PLA2 produit un acide gras et un lysophospholipide. Une variation significative de l'aire moléculaire est observable seulement dans le cas où les produits d'hydrolyse sont solubles dans la sous-phase. Cette technique est donc applicable à des monocouches constituées de phospholipides possédant des chaînes aliphatiques plus courtes que 12 carbones. En effet, l'acide gras et le lysophospholipide produit par l'hydrolyse de tels phospholipides sont solubles dans la sous-phase. Ainsi, le déplacement de la barrière mobile nécessaire pour garder la pression constante devient proportionnel à l'avancement de la réaction. L'utilisation d'une cuve rectangulaire conventionnelle (figure 16a) oblige la transformation semi-logarithmique de la cinétique car la surface du film phospholipidique diminue pendant l'hydrolyse. De plus, il est presque impossible d'obtenir, avec ce type de cuve, une distribution uniforme de l'enzyme. Pour pallier à ces inconvénients, Verger et de Haas (1976) ont mis au point une cuve (figure 16b) à deux

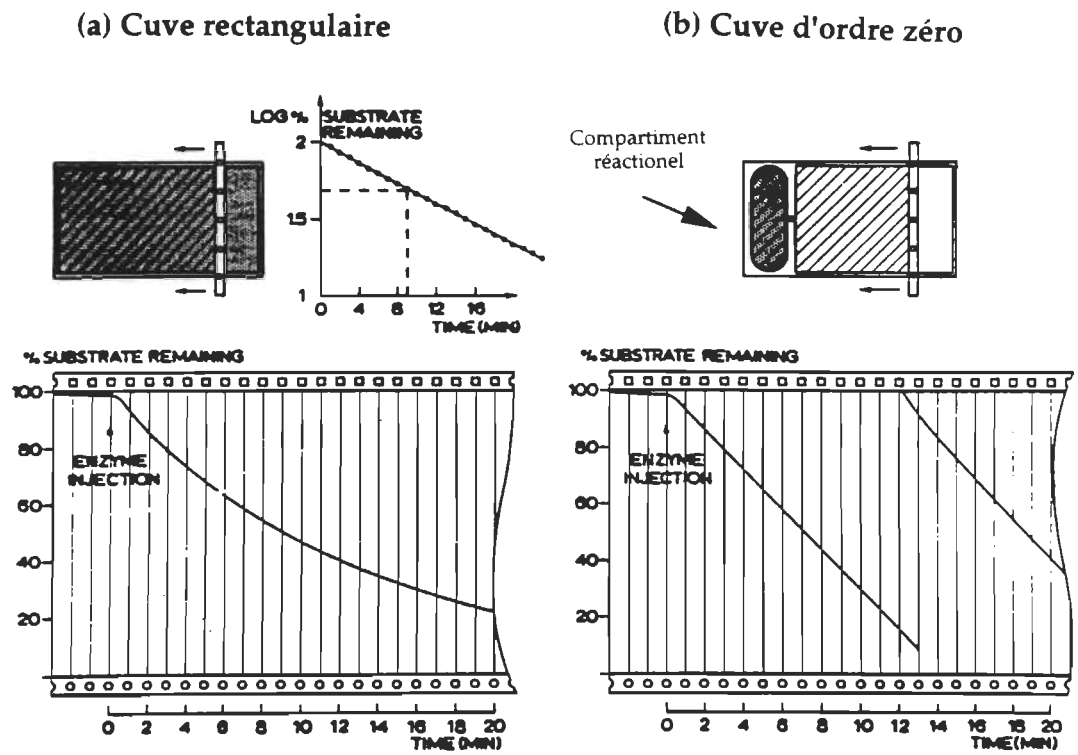


Figure 16 Comparaison entre les cinétiques d'hydrolyse de monocouches lipidiques par la PLA2 obtenues avec (a) une cuve rectangulaire et (b) une cuve d'ordre zéro (Verger et Rivière, 1987).

compartiments séparés par un canal permettant la libre circulation de la monocouche tout en empêchant le transfert de la sous-phase. L'enzyme est injectée dans le compartiment réactionnel sous agitation alors que l'autre compartiment sert de réservoir pour remplacer les produits d'hydrolyse solubilisés dans le compartiment réactionnel. Ce type de cuve donne des cinétiques d'hydrolyse linéaires d'où son nom de cuve d'ordre zéro. Dans ce travail, nous avons fait les mesures d'hydrolyse avec une cuve rectangulaire à laquelle nous avons ajouté un masque de téflon circulaire (figure 17) sous agitation et muni d'un canal, selon les spécifications de Verger et de Haas (1976).

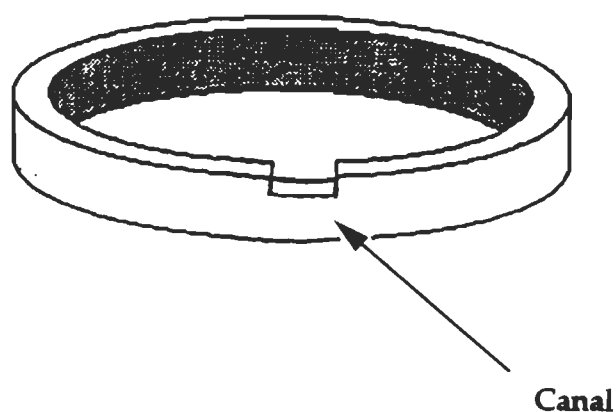


Figure 17 Schéma du masque ajouté à une cuve rectangulaire pour obtenir une cinétique d'ordre zéro.

2.2.1 Préparation des monocouches et injection de la PLA2 dans la sous-phase

Toutes les monocouches ont été obtenues en étalant une solution lipidique à l'interface air-eau à l'aide d'une seringue. Les solutions lipidiques ont été préparées en solubilisant les lipides dans un volume connu d'hexane : éthanol (9:1). Avant chaque mesure, on laisse le solvant d'étalement s'évaporer au moins 30 min. Dans les mesures faites avec le DDPC et les peptides, les peptides ont été ajoutés à une solution d'étalement de DDPC pour donner les différents rapports molaires utilisés. Pour ce qui est des mesures faites avec le DPPC et les peptides, les peptides en solution aqueuse ont été injectés dans la sous-phase de la monocouche. La PLA2, la PLC et la BSA ont été solubilisés dans un tampon identique au tampon de la sous-phase de la monocouche lipidique. Les mesures d'hydrolyse ont été réalisées en injectant un volume (typiquement 20 μ l) de ces solutions dans la sous phase. Les concentrations de ces protéines dans la sous-phase sont données dans la légende des figures.

2.2.2 Hydrolyse de monocouches de DDPC et DDPC-peptide

Les cinétiques d'hydrolyse des monocouches de didodécanylphosphatidylcholine (DDPC, Sigma Chemical) pure ou des mélanges binaires DDPC-mélettine, DDPC-LK22 ou DPPC-LK12 ont été obtenues en mesurant les variations d'aire moléculaire à pression de surface constante selon la technique décrite à la section précédente (voir section 2.2). La mélettine (Sigma Chemical, sequencing grade) a été décrite dans l'introduction (section 1.3) alors que le LK22 et le LK12 (gracieuseté du Dr. Jean Dufourcq, CRPP, CNRS, Bordeaux, France) sont décrits à la section 6.1 du chapitre 6. Les monocouches de DDPC

pure ou de DDPG-peptide (2 mol% de peptide) ont été étalées sur un tampon contenant 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl et 10 mM Tris (pH 8.9) à une température de 25 °C. Le pH 8.9 correspond au maximum d'activité de la PLA2. Les films ont ensuite été comprimés à une vitesse de $5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ minute}^{-1}$ jusqu'à une pression de 15 mN/m afin de d'augmenter la solubilisation des produits d'hydrolyse dans la sous-phase. Par la suite, 20 mg de PLA2 (bee venom, Sigma) ont été injectés à l'intérieur du masque de téflon soumis à une faible agitation afin de permettre la distribution uniforme de l'enzyme. Lors de ces mesures, on peut voir que les variations d'aire moléculaire corespondent à des variations d'aire moléculaire du réservoir de la cuve d'ordre zéro (voir figure 16). Il est en effet impossible de normaliser ces variation par rapport à l'aire du compartiment réactionnel (voir figures 16 et 17) car la surface lipidique contenue dans le compartiment réactionnel (masque) est hydrolysée plusieurs fois pendant la même cinétique.

2.2.3 Hydrolyse de monocouches de C6C16-PC et de C16C6-PC

Les mesures de l'hydrolyse des monocouches de 1-caproyl-2-palmitoyl-sn-3-phosphatidylcholine (C6C16-PC) ou 1-palmitoyl-2-caproyl-sn-3-phosphatidylcholine (C16C6-PC) ont été faites en mesurant simultanément les variations de l'aire moléculaire et du potentiel de surface à pression de surface constante. Ces deux lipides, dont la structure est montrée à la figure 18, ont été obtenus du laboratoire du Dr Mary Roberts (Boston College, Chestnut Hill). La synthèse de ces lipides a été décrite par Lewis et al. (1990). Il a été déterminé que le C6C16-PC et le C16C6-PC contenaient, respectivement, 4 mol% et 6 mol% d'impuretés de l'autre isomère (e.g. il y a 4 mol% de C16C6-PC dans le C6C16-PC). Le fait qu'un

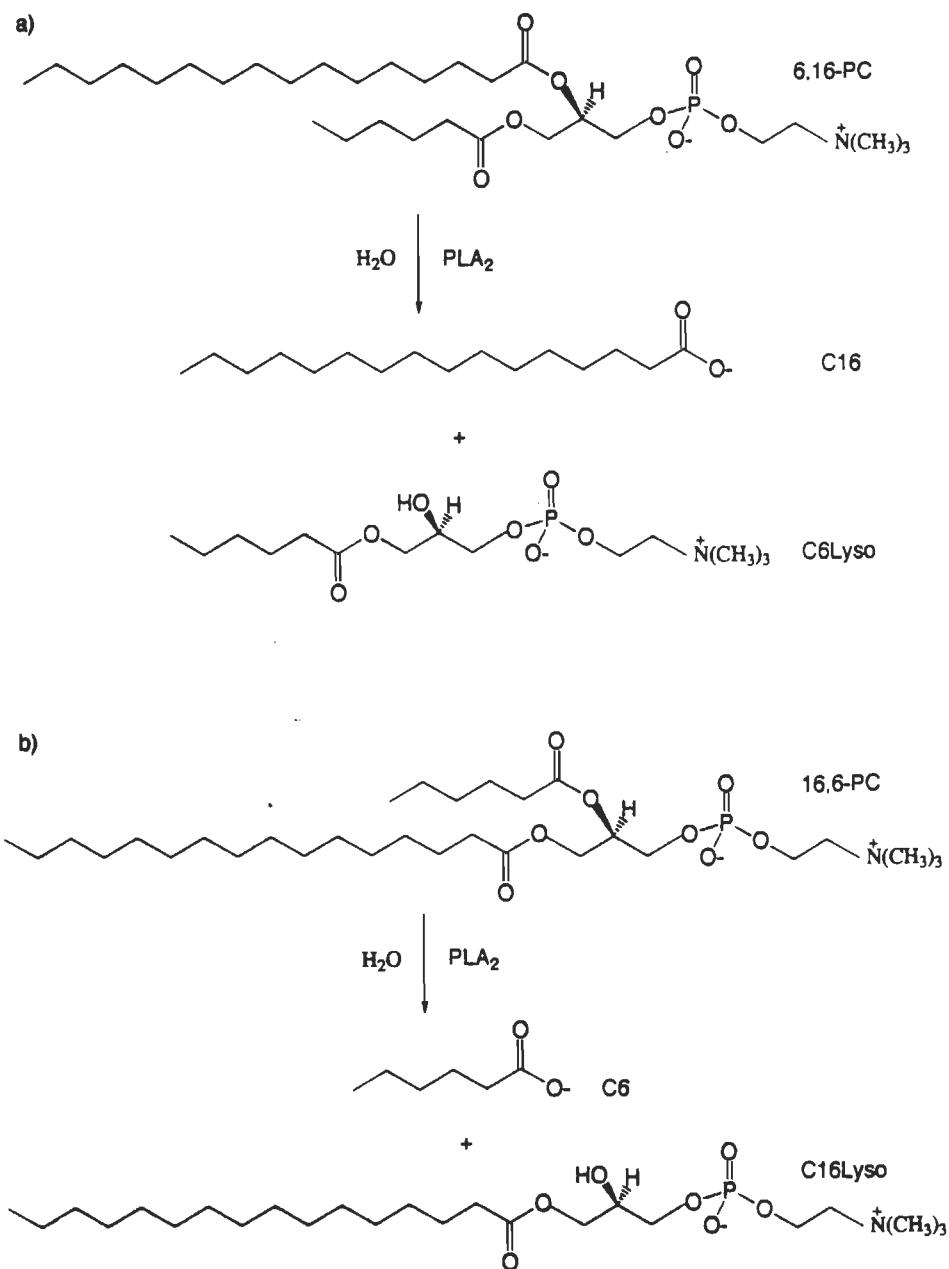


Figure 18 Hydrolyse des phospholipides asymétriques par la PLA2
(a) C6C16-PC et (b) C16C6-PC.

des deux produits d'hydrolyse soit soluble dans la sous-phase (C6lyso-PC pour l'hydrolyse du C6C16-PC et l'acide caproïque pour le C16C6-PC) a rendu possible l'utilisation du même montage que pour la DDPC. Lors de ces mesures, l'aire moléculaire a été normalisée par rapport à l'aire du masque où la PLA2 est injectée. Cette normalisation permet d'associer les variations d'aire moléculaire dues au déplacement de la barrière aux variations d'aire moléculaire à l'intérieur du masque qui sont dues aux changements de composition de la monocouche suite à son hydrolyse par la PLA2.

À l'instar des mesures faites avec le DDPC à la section 2.2.2, il a été aussi possible de mesurer les variations du potentiel de surface avec les deux lipides asymétriques puisqu'un des deux produits d'hydrolyse demeure à l'interface. Les variations du potentiel de surface sont directement associées à l'apparition des produits d'hydrolyse qui possèdent un potentiel de surface différent de la monocouche avant l'hydrolyse. Cependant, les cinétiques d'hydrolyse obtenues ne sont pas linéaires puisqu'un des deux produits reste à l'interface, ce qui a pour effet de diluer le phospholipide non-hydrolysé à l'interface. Le potentiel de surface a été mesuré en plaçant l'électrode radioactive directement au-dessus du masque de téflon. Les monocouches de C6C16-PC et de C16C6-PC ont été étalées sur un tampon contenant 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl et 10 mM Tris (pH 8.9) à une température de 25 °C. Les films ont ensuite été compressés à une vitesse de 2 Å² molécule⁻¹ minute⁻¹ jusqu'à une pression de surface de 15 mN/m (voir l'isotherme du C6C16-PC et du C16C6-PC en figure 27). Cette pression de surface a été utilisée afin de favoriser la solubilisation dans la sous-phase des produits d'hydrolyse i.e. l'acide caproïque pour l'hydrolyse du C16C6-PC et C6Lyso-PC pour l'hydrolyse du C6C16-PC). Par la suite, 20 µg de PLA2 ont été injectés à l'intérieur du masque de téflon sous agitation.

2.2.4 Hydrolyse de monocouches de DPPC et DPPC-peptide

L'hydrolyse d'une monocouche de DPPC n'entraîne pas de variation de l'aire moléculaire à pression de surface constante dû au fait que les produits d'hydrolyse restent à l'interface. Ceci rend impossible la mesure de la cinétique d'hydrolyse par la méthode de Verger et de Haas (1976) (voir section 2.6). Les mesures de cinétique d'hydrolyse des monocouches de DPPC par la PLA2 ont donc été obtenues en mesurant la variation du potentiel de surface à pression constante. Les monocouches de DPPC ont été étalées sur un tampon contenant 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl et 10 mM Tris (pH 8.9) à une température de 25 °C. Les films ont ensuite été compressés à une vitesse de 5 Å² molécule⁻¹ minute⁻¹ jusqu'à la transition de phase LE/LC (7 mN/m; voir l'isotherme du DPPC en figure 24) afin de pouvoir les comparer avec les mesures d'épifluorescence. La mélittine ou ses peptides analogues LK22 et LK12 ont ensuite été injectés dans la sous-phase du masque de téflon pour donner une concentration de 10⁻⁶ M. Après 20 min d'attente, 20 µg de PLA2 ont été injectés à l'intérieur du masque de téflon sous agitation.

2.3 La microscopie à épifluorescence

La microscopie à épifluorescence rend possible la visualisation d'une monocouche grâce à l'incorporation d'une sonde fluorescente. La figure 19 schématise le montage utilisé pour obtenir les micrographies d'épifluorescence. Le microscope (Nikon) est monté directement au-dessus d'une cuve de Langmuir pouvant être déplacée en x et y grâce à une plate-forme mobile, ce qui permet le balayage de la monocouche par l'objectif. Le microscope est

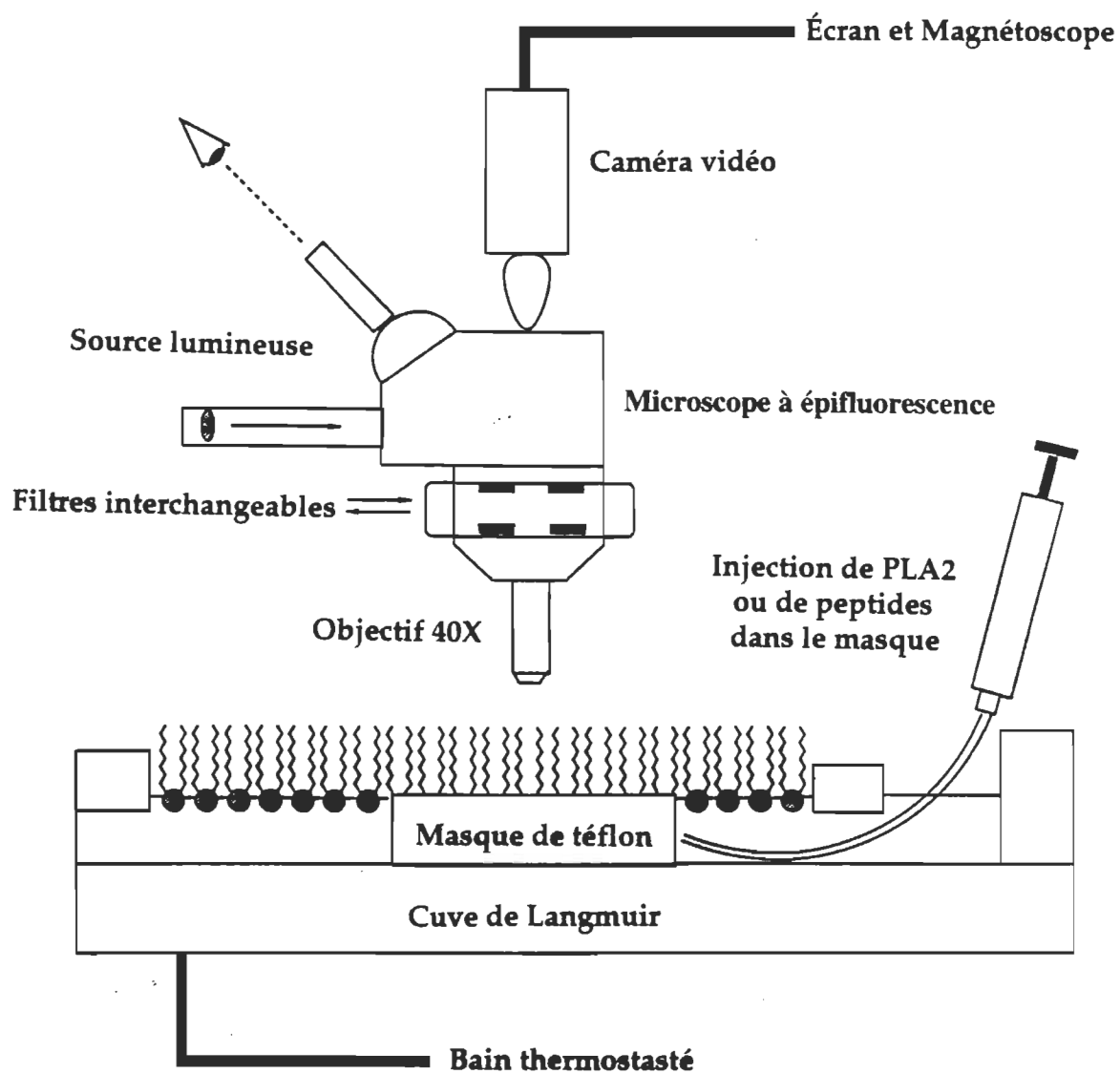


Figure 19 Microscope à épifluorescence monté au-dessus d'une cuve de Langmuir.

composé d'une source lumineuse responsable de l'excitation de la sonde fluorescente. La lumière d'excitation est acheminée vers la monocouche, via un jeu de filtres et un miroir dichroïque, par un objectif à très grande distance de travail (environ 4 mm). La fluorescence de la sonde présente dans la monocouche est ensuite acheminée via le miroir dichroïque à une caméra vidéo (Hamamatsu C2400) branchée à un magnétoscope (Sony VO 9800). Les micrographies sont imprimées à l'aide d'une imprimante vidéo Sony (VP 850). Le jeu de filtres est sans aucun doute la pièce maîtresse d'un microscope à épifluorescence. Ce jeu de filtres est d'abord composé d'un filtre interférentiel d'excitation. Ce genre de filtre possède une bande passante relativement étroite correspondant à la longueur d'onde du maximum d'absorption de la sonde fluorescente utilisée. La lumière transmise par le filtre d'excitation est ensuite dirigée vers le miroir dichroïque qui la réfléchit vers l'objectif. La lumière ainsi focalisée sur le spécimen entraîne la production de fluorescence qui est ensuite captée par l'objectif et dirigée vers le miroir dichroïque qui est conçu pour être transparent à la longueur d'onde d'émission de l'échantillon. La fluorescence traverse ensuite un filtre passe-haut et est ensuite focalisée au niveau de la caméra vidéo.

2.3.1 Visualisation de transitions de phase par microscopie à épifluorescence

La visualisation des transitions de phase de phospholipides à l'interface air-eau représente la première application de la microscopie à épifluorescence aux monocouches (Peters and Beck., 1983). Dans ces études, les auteurs ajoutent 2 mol% d'un lipide fluorescent dont la structure est analogue au phospholipide utilisé afin de visualiser les phases solide et liquide des phospholipides. Le

contraste est possible grâce à la différence de solubilité de la sonde entre la phase solide (domaine sombre) et la phase liquide (matrice brillante). La figure 20 montre les micrographies d'une monocouche de DPPC dopée à 2 mol% avec un lipide fluorescéine. La micrographie A est prise dans la région liquide de l'isotherme de pression de surface. Cette micrographie montre une monocouche complètement uniforme où la sonde fluorescente est complètement miscible avec la DPPC. La micrographie C est prise dans la région de la transition de phase liquide-expansé/liquide-condensé (LE/LC) du DPPC. Cette image montre des domaines sombres de DPPC dans l'état solide, d'où la sonde est absente et qui sont entourés de DPPC dans l'état liquide-expansé (LE) où la sonde est très soluble. La sonde se partitionnera préférentiellement dans la phase liquide expansé parce qu'elle se trouve elle-même dans cet état physique. Si on continue la compression de la monocouche, on obtient une image presque entièrement sombre correspondant à une monocouche de DPPC dans l'état liquide condensé (LC) (micrographie H). Il existe aujourd'hui plusieurs types de sondes permettant de visualiser les films lipidiques. Il est possible, par exemple, de visualiser un film à partir de sondes solubles dans la sous-phase et qui interagissent avec la partie polaire du film lipidique (Lavigne et al., 1994). Dans ce travail, la visualisation de monocouches par microscopie à épifluorescence a été réalisée à l'aide de sondes fluorescentes liées aux phospholipides, aux peptides ou à la PLA2. De cette façon, il a été possible de visualiser directement la structure macroscopique des monocouches. Le dipalmitoylphosphatidyléthanolamide-rhodamine (DPPE-Rho) provient de Molecular Probes. Les peptides dansylés proviennent du laboratoire du Dr. Dufourcq (CNRS, France).

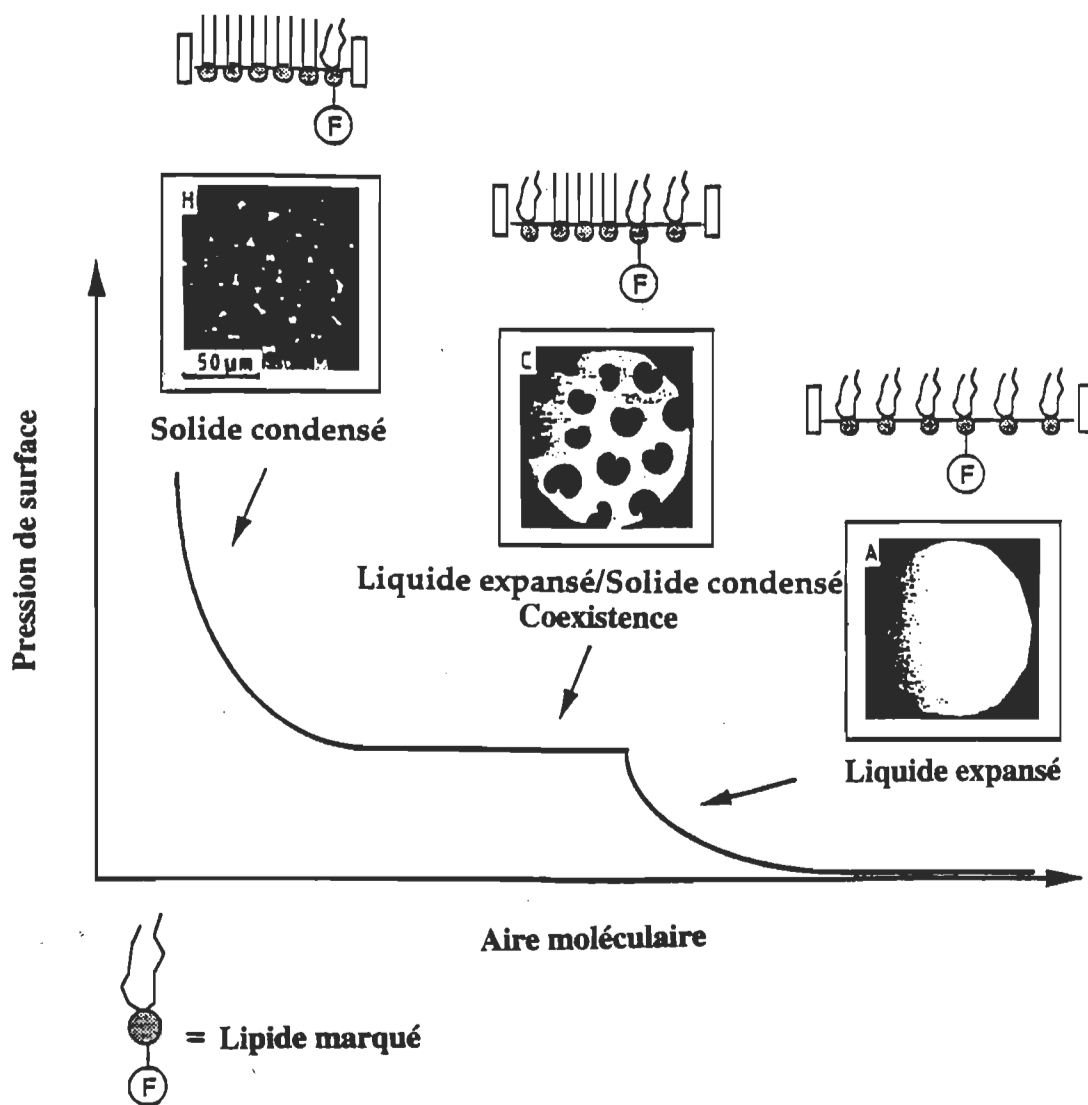


Figure 20 Isotherme du DPPC et visualisation de la transition de phase LE/LC par microscopie à épifluorescence.

2.3.2 Marquage de la PLA2

Le marquage de la PLA2 par la rhodamine-X-isothiocyanate (XRITC, Molecular Probes) ou la fluorescéine-isothiocyanate (FITC, Molecular Probes) a été réalisé dans un tampon phosphate (10 mM) à pH 9 selon la méthode de Nargessi et Smith (1986). Le rapport initial entre la sonde et la PLA2 était de 5. Après une heure de réaction, la sonde n'ayant pas réagi avec la PLA2 a été séparée à l'aide d'une colonne de Sephadex G-50M. La protéine ainsi préparée a été congelée sous forme d'aliqots de 100 microlitres utilisables pour une seule expérience. Cette congélation n'entraîne aucune perte d'activité de l'enzyme.

2.4 Spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'obtenir des informations de nature structurale et organisationnelle de molécules complexes comme les protéines et les phospholipides. En effet, il est possible d'étudier l'organisation et l'orientation de phospholipides en vésicules par FTIR comme le montrent les études de Bush et al. (1980) et Blume et al. (1988). Dans ce travail, la spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation a été utilisée pour obtenir des informations structurales de protéines et de phospholipides directement à l'interface air-eau. La mesure de la réflectivité totale d'un faisceau sur une monocouche est très difficile en raison de la très faible quantité de molécules à détecter par rapport à la vapeur d'eau et à l'eau présente dans la sous-phase qui absorbe beaucoup dans les régions d'intérêt. Les instabilités du spectromètre ainsi que du système de détection sont aussi deux facteurs qui perturbent la mesure de la réflectivité

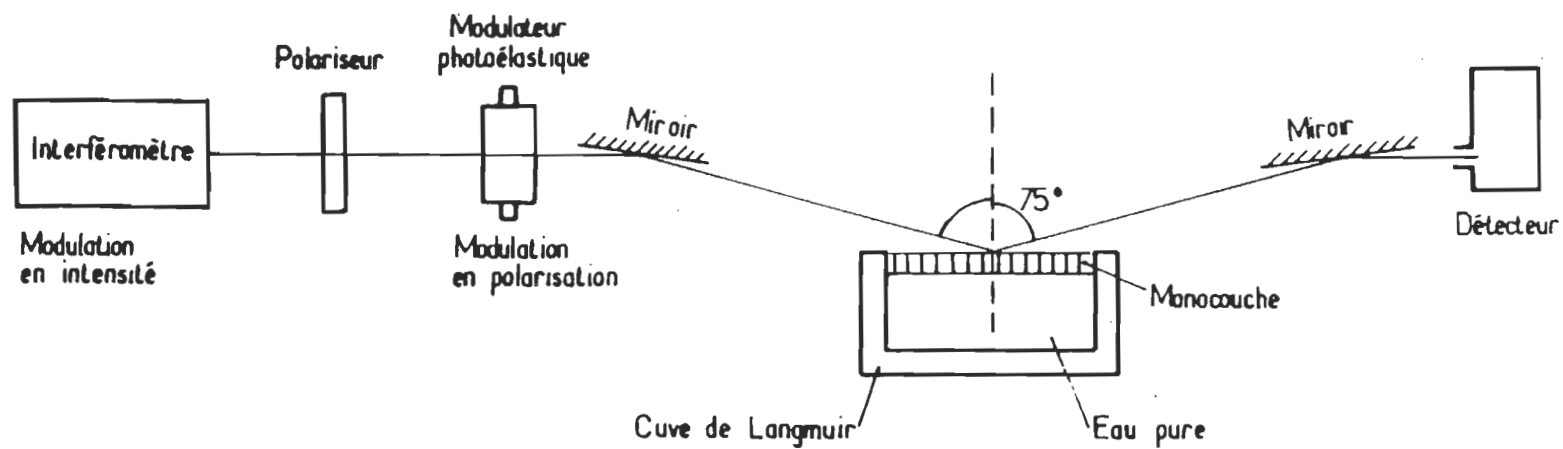


Figure 21 Schéma du montage de spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air-eau (Blaudez, 1993)

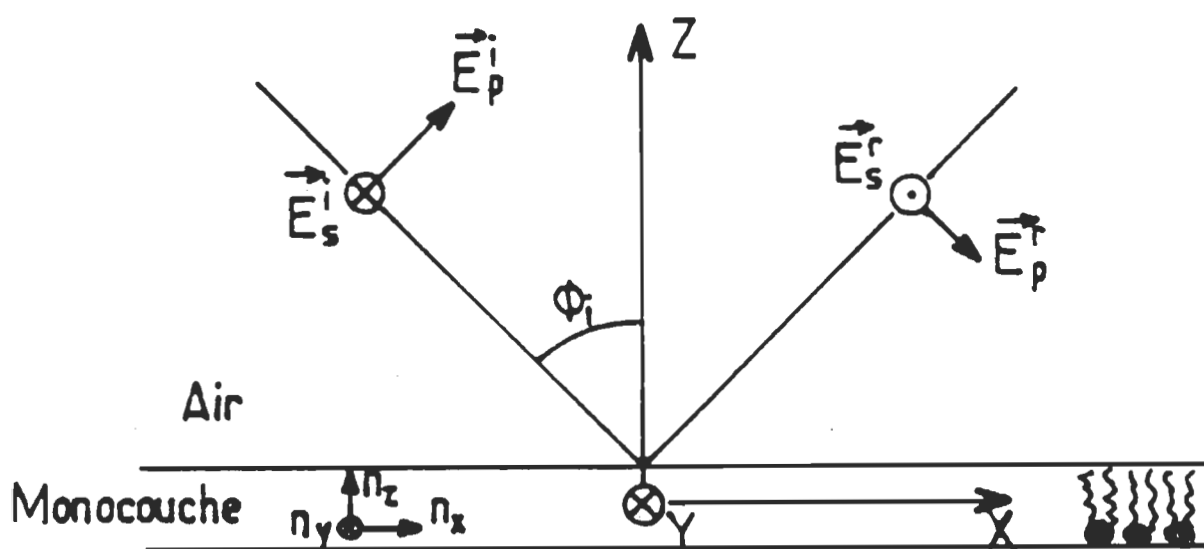


Figure 22 Définition du référentiel de la monocouche et du déphasage introduit dans le champ électrique du faisceau (Blaudez, 1993).

2.4.1 Particularités de la mesure

Le référentiel (x,y,z) de la monocouche est montré à la figure 22. Ce schéma montre les déphasages introduits dans les champs électriques parallèle (E_p) et perpendiculaire (E_s) au plan d'incidence (x,z) du faisceau réfléchi. La valeur des champs électriques selon (x,y,z) est non nulle directement à l'interface, ce qui signifie qu'il sera possible de détecter les moments de transition infrarouge, peu importe leur orientation. Ainsi, une onde polarisée p interagit seulement avec les moments de transition orientés dans le plan (x,z) alors qu'une onde polarisée s interagit seulement avec les moments de transition orientés selon (y) . La modulation de polarisation est donc nécessaire si on veut détecter l'ensemble des moments de transition à l'interface. De plus, afin de minimiser la contribution du diélectrique (sous-phase aqueuse) dans le signal de réflectivité, on soustrait le spectre de la monocouche du spectre du diélectrique et on normalise par le spectre de la monocouche selon l'expression suivante,

$$\frac{\Delta S}{S(o)} = \frac{S(m)-S(o)}{S(o)} \quad (6)$$

où $S(m)$ est le signal de réflectivité d'une monocouche sur un tampon, $S(o)$ le signal de la sous-phase sans monocouche et ΔS le spectre infrarouge de la monocouche. Cette soustraction du signal de la monocouche du signal du diélectrique entraîne une propriété très intéressante des spectres PM-IRRAS qui est liée à l'orientation des bandes infrarouge observées. La figure 23 (Blaudez, 1993) montre le résultat de la simulation à partir de laquelle a été obtenu l'angle optimal de réflexion (75°) pour la mesure du signal PM-IRRAS. Sur cette figure, les auteurs ont calculé les variations du signal PM-IRRAS (ΔS) en

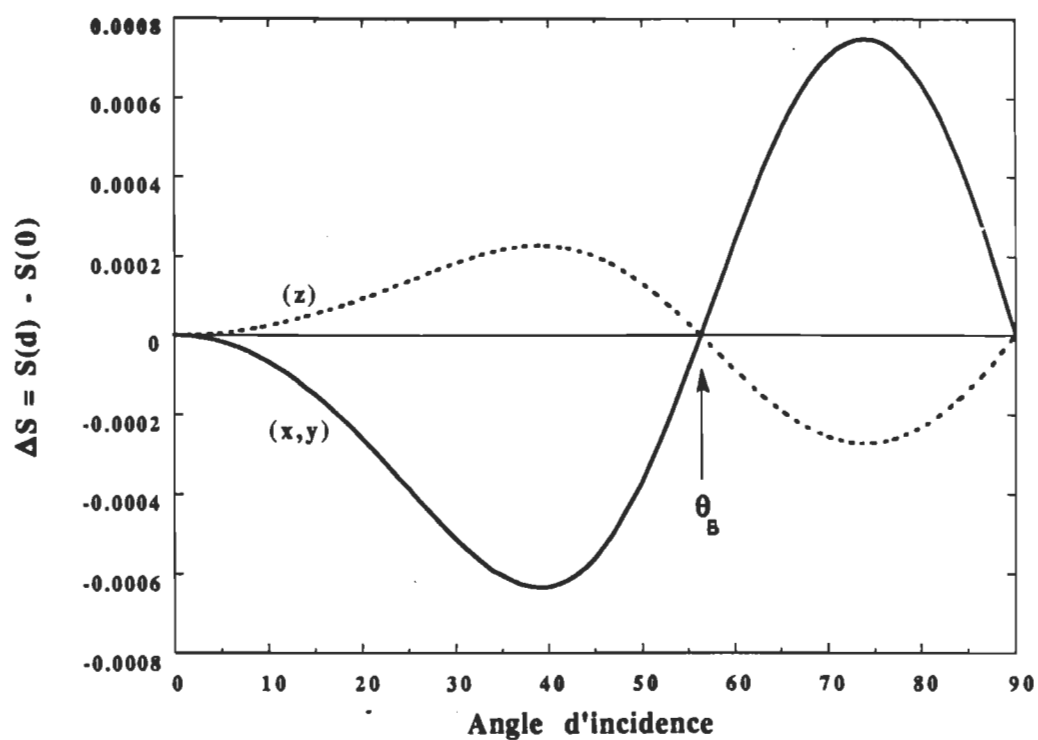


Figure 23 Variations calculées du signal PM-IRRAS en fonction de l'angle d'incidence pour des absorptions situées parallèlement (x,y) et perpendiculairement (z) au plan de la surface (Blaudez, 1993)

fonction de l'angle d'incidence du faisceau pour des absorptions (moments de transition) situées parallèlement (x,y) et perpendiculairement au plan de la surface. Les résultats de cette simulation montrent que pour un angle de 75° les $|\Delta S|$ sont maximaux et que les moments de transition parallèles (x,y) au plan de la monocouche donnent un signal ΔS positif alors que les moments de transition perpendiculaires donnent un signal ΔS négatif. Ainsi, l'orientation positive ou négative des bandes infrarouges d'un spectre pourra apporter des informations sur l'orientation des molécules à l'interface.

2.4.2 Mesure des spectres PM-IRRAS

Les mesures d'hydrolyse de films phospholipidiques par la PLA2 ou la PLC (Sigma Chemical) ont été réalisées à l'aide d'une cuve de téflon construite au laboratoire. Les dimensions de cette cuve ont été choisies afin d'éviter les effets de bord dus au ménisque et afin de limiter le volume de la sous-phase. La pression de surface a été mesurée par la méthode de Wilhelmy. La cuve était recouverte d'une cloison de plastique pendant la mesure de façon à limiter les impuretés et les mouvements de convection de la monocouche dus à la circulation de l'air ambiant. Dans certain cas, les variations de l'intensité des bandes ont été évaluées en mesurant l'aire sous la bande d'absorption de façon mathématique à l'aide d'un programme informatique (NIC-IR) et par le découpage et le pesage des différentes bandes. Les deux techniques ont donné des résultats presque identiques.

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE LA COMPOSITION DES DOMAINES DE PLA2 EN MONOCOUCHE À L'INTERFACE AIR-EAU: MESURES D'ÉPIFLUORESCENCE, DE VARIATION D'AIRE MOLÉCULAIRE ET DE POTENTIEL DE SURFACE.

3.1 Introduction

Il a été montré, par microscopie à épifluorescence, que la PLA2 attaque et hydrolyse de façon spécifique les domaines de DPPC à l'état solide condensé en monocouche (voir fig. 24). L'hydrolyse de cette monocouche entraîne la formation de domaines de PLA2 à l'interface air-eau (Grainger et al., 1989 et 1990). Les micrographies a-c de la figure 13 (voir section 1.4.1) montrent l'hydrolyse de domaines solides de DPPC tel qu'observé par Grainger et al. (1989) par microscopie à épifluorescence. La sonde lipidique présente dans la monocouche permet de visualiser la dégradation des domaines solides de DPPC dans l'état solide-condensé par la PLA2 à différents temps d'hydrolyse. Les micrographies d à f sont obtenues à partir de la fluorescence de la PLA2 marquée et montrent la formation de domaines de cette enzyme après un certain temps d'hydrolyse. Ces auteurs ont proposé un modèle de formation de ces domaines de PLA2 où l'enzyme reconnaît et lie de façon spécifique les phospholipides à la frontière entre l'état solide et liquide des domaines de DPPC dans l'état liquide-condensé (figure 25A). L'hydrolyse de la monocouche entraîne ensuite une accumulation des produits d'hydrolyse (acides gras et lysophospholipides) à l'interface air-eau (figure 25B). La séparation de phase des

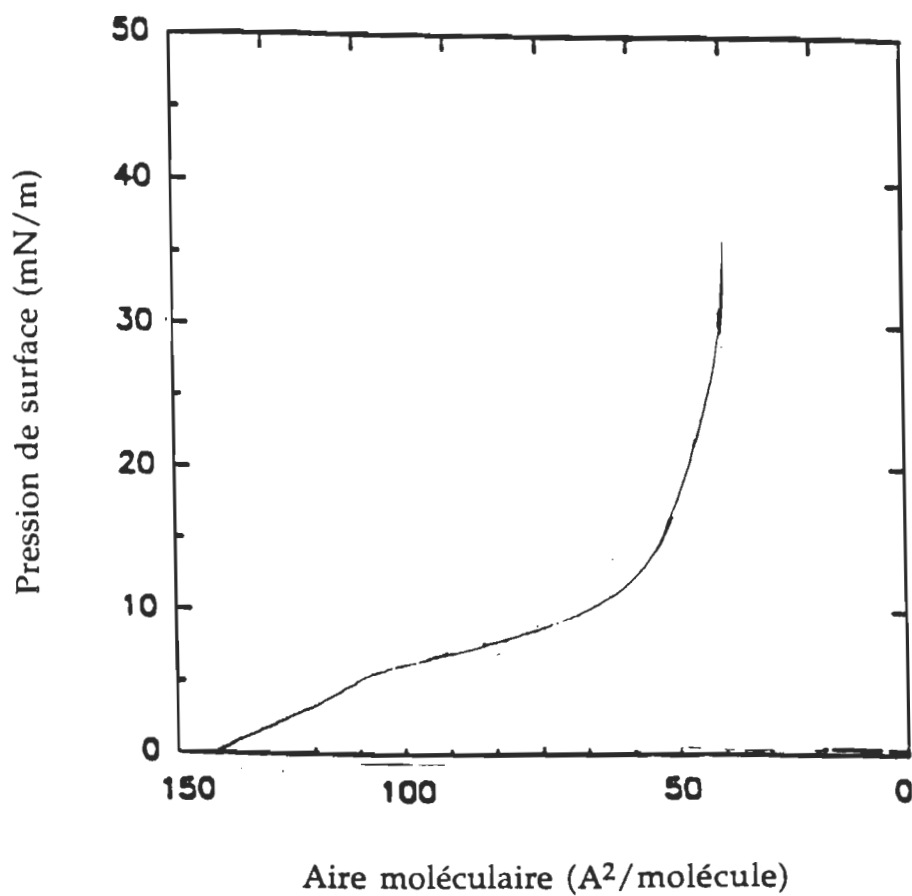


Figure 24 Isotherme du DPPC montrant la transition de phase à 7-8 mN/m.

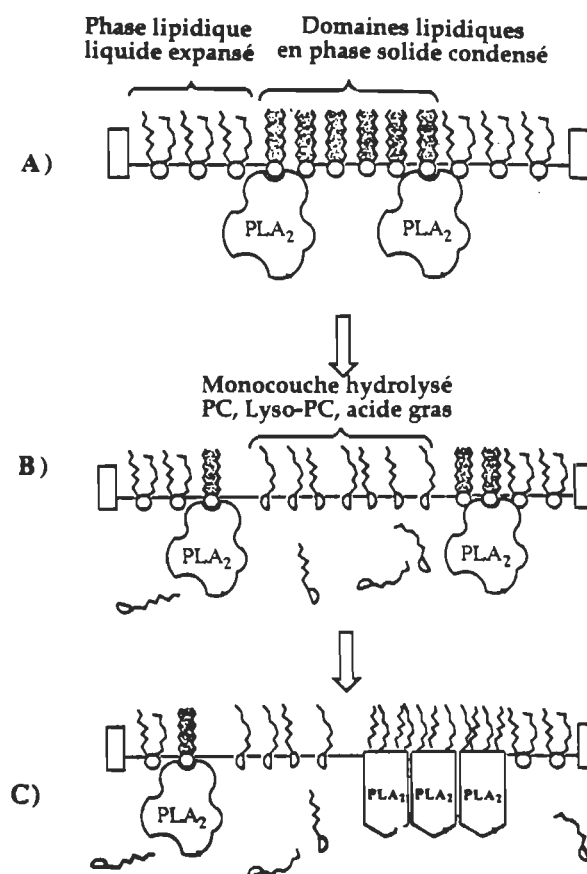


Figure 25 Modèle de formation des domaines de PLA₂ à l'interface air-eau tel que proposé par Grainger et al. (1989).

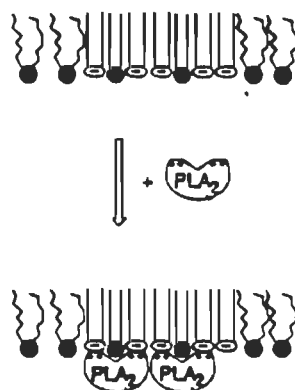


Figure 26 Modèle de formation des domaines de PLA₂ à l'interface air-eau tel que proposé par Reichert et al. (1992).

produits d'hydrolyse à partir d'une concentration critique entraîne ensuite la liaison et la formation de domaines de PLA2 à l'interface air-eau (figure 25C). Ce modèle est appuyé par les résultats de Maloney et Grainger. (1993) qui montrent, par microscopie à épifluorescence à l'aide d'une sonde fluorescente cationique, qu'un mélange ternaire de DPPC, lyso-PC et acide palmitique (0.2:1:1) produit, en absence de PLA2, des domaines de lipides chargés négativement et de forme similaire aux domaines de PLA2 observés par Grainger et al. (1989, 1990). Ces domaines sont observables seulement en présence de calcium et à un pH où l'acide palmitique est déprotoné. Il est impossible de dire, à partir de ces études, si ces domaines contenant des acides gras sont aussi composés de Lyso-PC et de DPPC. Il a aussi été proposé, par Reichert et al. (1992), que les deux produits d'hydrolyse étaient nécessaires à la formation des domaines de PLA2, i.e. l'acide palmitique et la Lyso-PC. Cette proposition est fondée sur le fait que la PLA2 ne s'adsorbe pas sur des domaines cristallin d'acide diacétylénique carboxylique dans une monocouche fluide de phospholipides. Ces auteurs proposent donc un modèle un peu plus raffiné de la formation des domaines de PLA2 qui tient aussi compte de la présence de phospholipides ou lysophospholipides dans les domaines lipidique contenant des produits d'hydrolyse (figure 26). Il semble donc, à partir de ces résultats, que la seule présence d'acide gras au niveau de la monocouche ne soit pas suffisante pour produire les domaines de PLA2 avec la morphologie observée pendant l'hydrolyse des phospholipides (figure 13, micrographie F).

Selon l'hypothèse d'adsorption de la PLA2 aux domaines d'acide gras, l'hydrolyse enzymatique de phospholipides asymétriques par la PLA2 produisant un acide gras à courte chaîne soluble dans l'eau (voir figure 18b) ne devrait pas produire de domaines d'enzyme à l'interface air-eau. En effet, la

dissolution de l'acide gras dans la sous-phase devrait prévenir la formation de domaines de produits d'hydrolyse et ainsi inhiber la formation de domaines de PLA2. Par contre, l'observation de domaines de PLA2 à l'interface suite à l'hydrolyse de phospholipides asymétriques par la PLA2 produisant un acide gras insoluble et un lysophospholipide soluble (voir figure 18b) suggérerait que la présence d'acides gras est essentielle à la formation de ces domaines alors que le lysophospholipide n'est pas requis. Ces mesures permettront de clarifier cette question et de démontrer l'importance de chacun des produits d'hydrolyse dans la formation des domaines de PLA2.

Ce chapitre présente une étude de l'hydrolyse de monocouches de phospholipides asymétriques incluant soit le 1-caproyl-2-palmitoyl ou le 1-palmitoyl-2-caproyl-sn-3-phosphatidylcholine (voir figure 18) à l'interface air-eau. Trois différentes sources d'enzymes (pancréas bovin, venin d'abeille et venin de *N. naja naja*) ont été utilisées dans cette étude. La microscopie à épifluorescence a été utilisée pour visualiser l'interaction entre l'enzyme et la monocouche à l'interface air-eau. De plus, des mesures de potentiel de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps ont été réalisées afin de suivre l'évolution de l'hydrolyse de ces monocouches par la PLA2 (Maloney et al., 1995a, 1995b et 1997).

3.2 Résultats

3.2.1 Cinétique d'hydrolyse des lipides asymétriques

La figure 27 montre les isothermes des phospholipides asymétriques. Ces

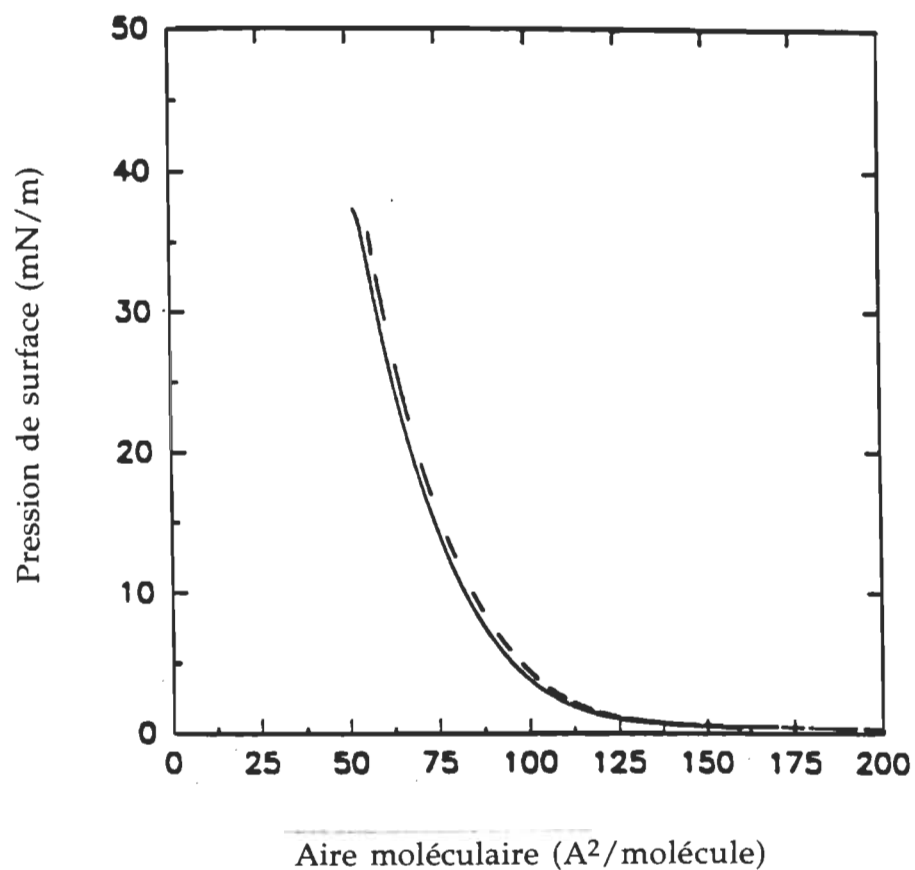


Figure 27 Isotherme du C16C6-PC (—) et du C6C16-PC (---). Vitesse de compression: $1.1 \text{ \AA}^2 \text{molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

isothermes ne montrent aucune transition de phase ce qui signifie que ces deux phospholipides sont dans l'état liquide-étendu peu importe la pression de surface. Ainsi l'hydrolyse des monocouches phospholipidiques se fait dans l'état liquide étendu. Les figures 28 et 29 montrent, respectivement, les cinétiques d'hydrolyse des monocouches de C16C6-PC et C6C16-PC par la PLA2 (*N.naja naja*). Ces cinétiques ont été obtenues en mesurant les variations de l'aire moléculaire et du potentiel de surface en fonction du temps. Trois segments distincts peuvent être discernés sur ces courbes. Le premier segment, AB, correspond à une monocouche avec une aire moléculaire et un potentiel de surface stable à une pression de surface de 15 mN/m. La PLA2 a été injectée dans la sous-phase de la monocouche au point B (voir flèche, figures 28 et 29). Après l'injection de l'enzyme, il est possible d'observer immédiatement une diminution de l'aire moléculaire et du potentiel de surface qui continue jusqu'au point C. Ce point correspond exactement à l'intersection entre les segments extrapolés BC et CD qui est interprété comme la fin de l'hydrolyse. Le segment CD montre ensuite la variation de l'aire moléculaire des produits d'hydrolyse demeurant à l'interface une fois l'hydrolyse complétée. Ce dernier segment représente un excellent indice de la stabilité de la monocouche après hydrolyse.

À la fin de l'hydrolyse de la monocouche du C16C6-PC (figure 28), l'acide caproïque formé (C6) devrait être complètement solubilisé dans la sous-phase alors que le palmitoyl-lysophosphatidylcholine (C16Lyso-PC) devrait demeurer à l'interface. L'aire moléculaire à la fin de l'hydrolyse de la monocouche de C16C6-PC devrait donc correspondre à l'aire moléculaire d'une monocouche de C16Lyso-PC pure à 15 mN/m, c'est-à-dire $50 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (voir l'aire moléculaire au temps zéro à la figure 30b). La figure 28 montre que l'aire

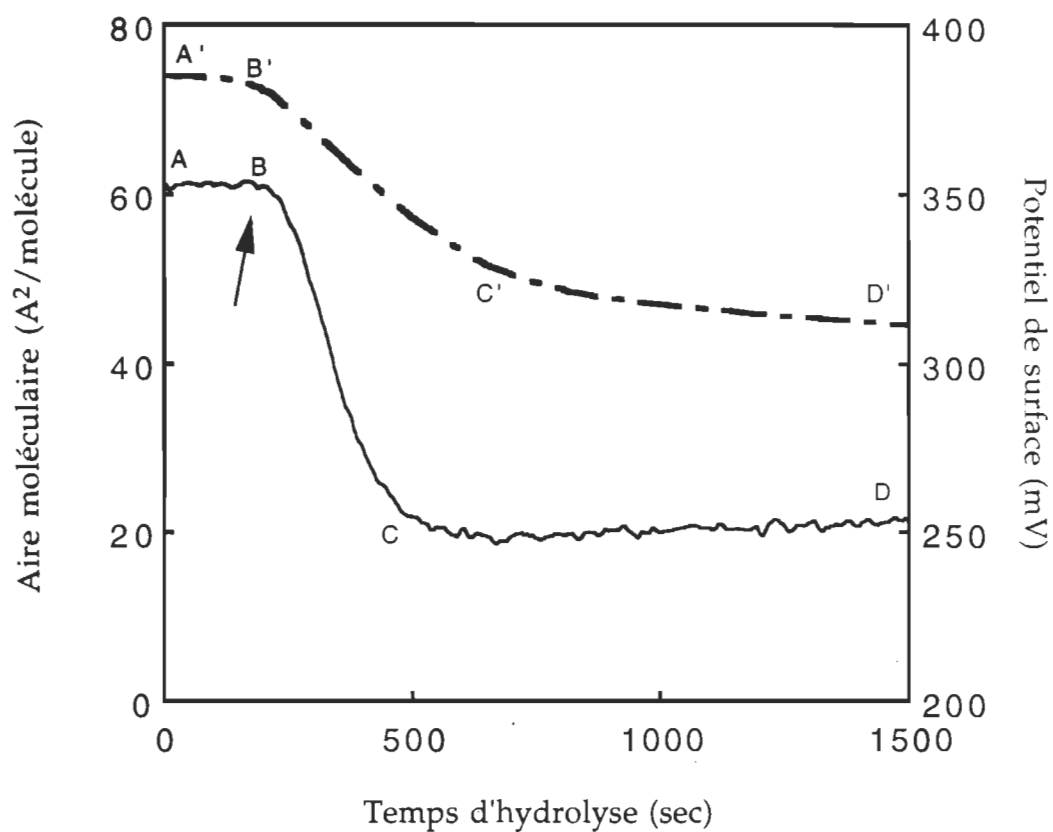


Figure 28 Graphique du potentiel de surface (—) et de l'aire moléculaire (---) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de C16C6-PC par la PLA2 à pression de surface constante (15 mN/m). La flèche indique le moment où la PLA2 est injectée dans la sous-phase.

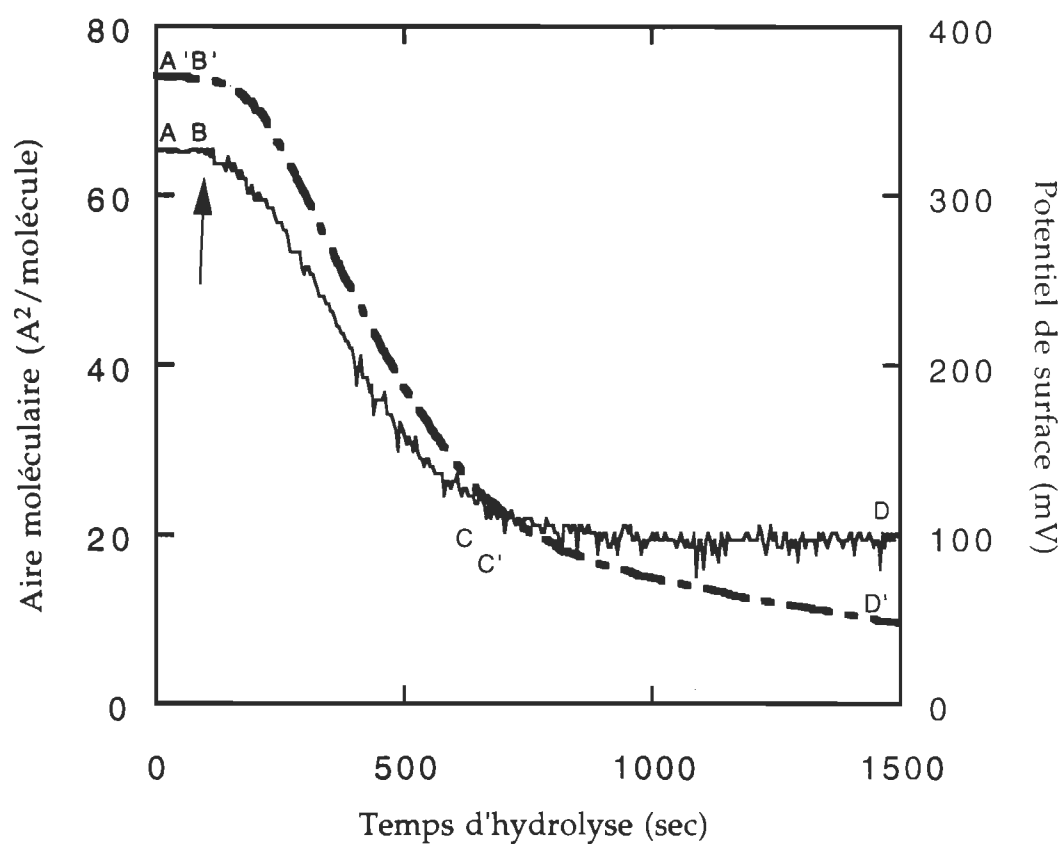


Figure 29 Graphique du potentiel de surface (—) et de l'aire moléculaire (- - -) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de C6C16-PC par la PLA2 à pression de surface constante (15 mN/m). La flèche indique le moment où la PLA2 est injectée dans la sous-phase.

moléculaire d'une monocouche de C16C6-PC hydrolysée par la PLA2 passe de 74 à 49.5 Å²/molécule (du point B' à C'). Cette valeur de 49.5 Å²/molécule est presque identique à l'aire d'une monocouche de C16Lyso-PC pure dans ces conditions expérimentales (50 Å²/molécule). La diminution lente de l'aire moléculaire après 49.5 Å²/molécule démontre l'instabilité intrinsèque de la monocouche de C16Lyso-PC résiduel. En effet, l'aire moléculaire d'une monocouche de C16Lyso-PC pure à pression constante (voir figure 30) varie de façon similaire au segment C'D'. À la figure 28, la diminution du potentiel de surface (du point B à C), suite à l'hydrolyse d'une monocouche de C16C6-PC par la PLA2, est due au changement des propriétés électrochimiques du film. Le potentiel de surface de la monocouche de C16C6-PC avant l'injection de la PLA2 dans la sous-phase (point B, 357 mV) diminue jusqu'à 248 mV, ce qui est très près de la valeur du potentiel de surface d'un film de C16Lyso-PC pure (220 mV) dans les mêmes conditions. Pour cette expérience, il a été estimé que la présence du 6% d'impuretés de C6C16-PC (l'autre lipide asymétrique) pouvait entraîner un différence d'environ 10 mV dans la valeur finale du potentiel de surface et d'environ 3 Å²/molécule de l'aire moléculaire. Il est donc clair que la présence de cette impureté a peu d'influence sur les résultats de potentiel de surface et d'aire moléculaire présentés à la figure 28.

Un comportement semblable a été obtenu dans le cas de l'hydrolyse du C6C16-PC par la PLA2 (figure 29). Cependant, dans ce cas, l'acide palmitique produit au cours de l'hydrolyse demeure à l'interface alors que le caproyllysophosphatidylcholine (C6Lyso-PC) est solubilisé dans la sous-phase de la monocouche. La dissolution du C6Lyso-PC entraîne une très grande diminution de l'aire moléculaire (74 à 19 Å²/molécule) et du potentiel de surface (328 à 100 mV). L'aire moléculaire de la monocouche au point C' (19

$\text{\AA}^2/\text{molécule}$) correspond très bien à celle d'une monocouche d'acide palmitique pur ($19.4 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) dans ces conditions expérimentales. Cependant, le potentiel de surface au point C (100 mV) est beaucoup plus grand que celui observé dans le cas d'une monocouche d'acide palmitique pur (-30 mV). Comme on le verra plus loin, il est fort probable que cette différence de potentiel de surface soit due à la présence des domaines de PLA2. Dans cette expérience, il a été estimé que la présence du 4% d'impuretés (C16C6-PC) pouvait mener à une différence d'environ 5 mV et $1 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ dans la mesure du potentiel de surface et de l'aire moléculaire à la fin de l'hydrolyse, respectivement. Ces petites différences peuvent donc être négligées et n'affectent pas les mesures. De façon similaire à la figure 28, la figure 29 montre un plateau dans le potentiel de surface (segment CD) à la fin de l'hydrolyse, alors que l'aire moléculaire montre une diminution constante (segment C'D'). Cette diminution est due à l'instabilité intrinsèque de la monocouche d'acide palmitique présente à la fin de l'hydrolyse. En effet, l'aire moléculaire d'une monocouche d'acide palmitique pur à une pression constante de 15 mN/m diminue avec une cinétique similaire à celle du segment C'D' dans les mêmes conditions expérimentales (voir fig. 31). En utilisant des PLA2 de pancréas ou de venin d'abeille, on obtient des cinétiques de potentiel de surface et d'aire moléculaire très similaires à celles montrées aux figures 26 et 27 où la PLA2 de *N. naja naja* était utilisée.

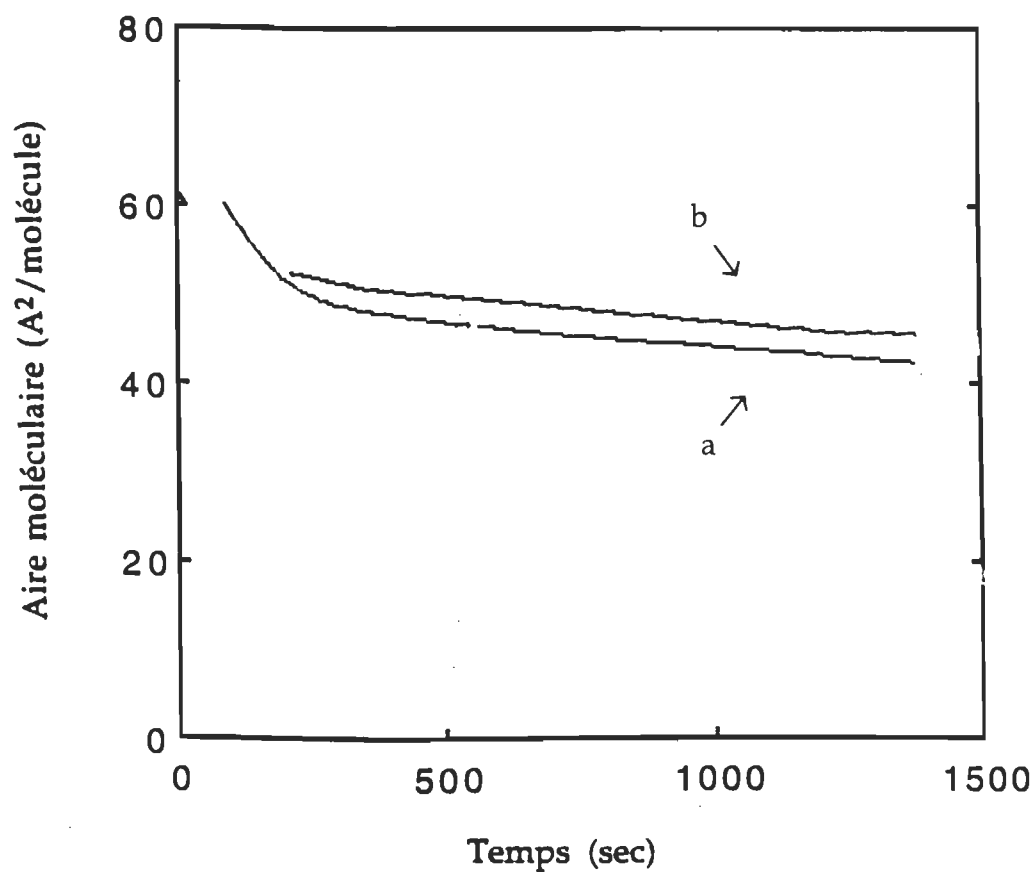


Figure 30. (a) Variation de l'aire moléculaire à la fin de l'hydrolyse du C16C6-PC. (b) Variation de l'aire moléculaire d'une monocouche de C16Lyso-PC à pression de surface constante (15 mN/m).

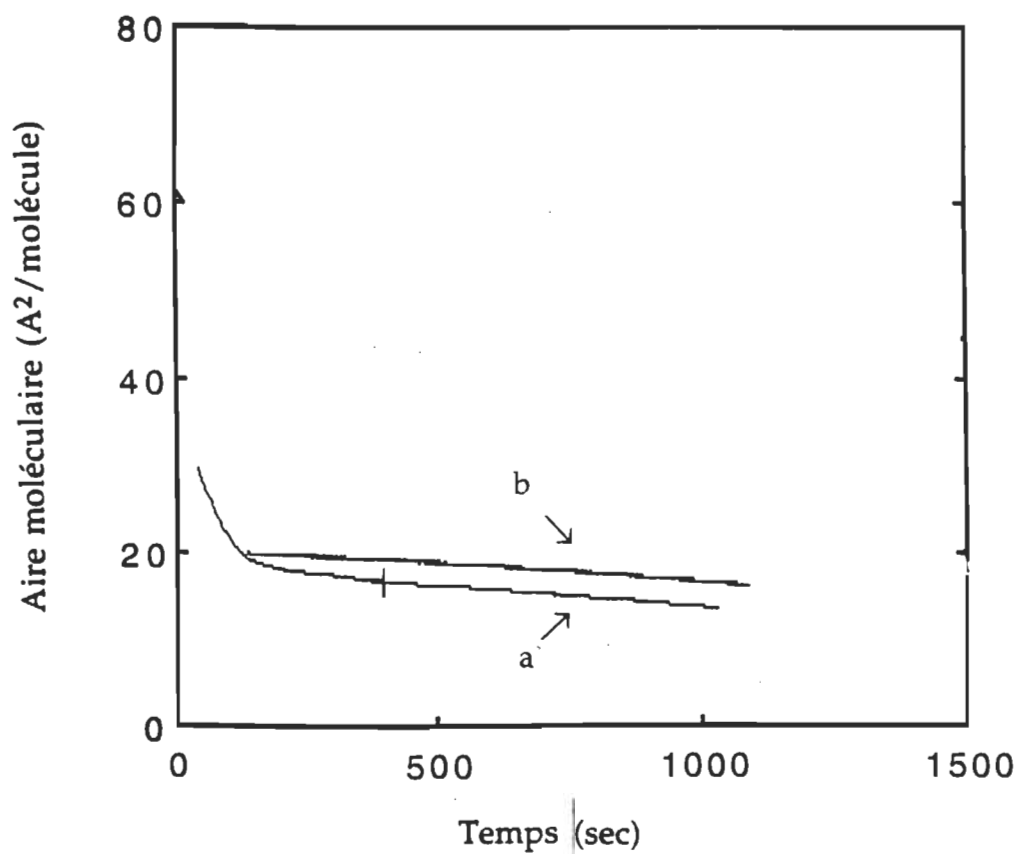


Figure 31. (a) Variation de l'aire moléculaire à la fin de l'hydrolyse du C6C16-PC. (b) Variation de l'aire moléculaire d'une monocouche d'acide palmitique à pression de surface constante (15 mN/m).

3.2.2 Visualisation de la formation de domaines lors de l'hydrolyse des lipides asymétriques et du PAF

L'action des différentes PLA2 sur les monocouches de C6C16-PC et C16C6-PC a aussi été caractérisée par microscopie à épifluorescence. La figure 32 montre des micrographies typiques de l'hydrolyse de monocouches de C6C16-PC après 60 min. Ces images ont été obtenues en observant la fluorescence de la PLA2 de *N. naja naja* marquée avec de la rhodamine. Des micrographies tout à fait similaires ont été obtenues avec les PLA2 de pancréas et de venin d'abeille. Sur ces micrographies, on observe de nombreux domaines de PLA2 sans forme spécifique et très différent de ceux observés à la figure 13 (Grainger et al. 1989, 1990). L'ajout d'albumine bovine (BSA), qui est bien connue pour lier les acides gras, dans la sous-phase de la monocouche n'a aucun effet sur la formation et sur l'organisation générale des domaines de PLA2 présentés à la figure 32.

Dans le cas de l'hydrolyse de monocouches de (C16C6-PC) où l'acide gras est soluble dans la sous-phase, plusieurs heures sont nécessaires afin d'observer la formation de domaines (figure 33). Dans ce cas, les domaines de PLA2 qui sont observés après une longue période d'hydrolyse sont très petits et très peu nombreux comparativement à ceux observés lors de l'hydrolyse du C6C16-PC. Cependant, comme dans le cas du C6C16-PC, les domaines formés avec le C16C6-PC ne montrent aucune forme spécifique. L'ajout de BSA à la sous-phase empêche complètement la formation de ces domaines de PLA2. Par conséquent, la présence d'acide gras semble essentielle à la formation des ces domaines.

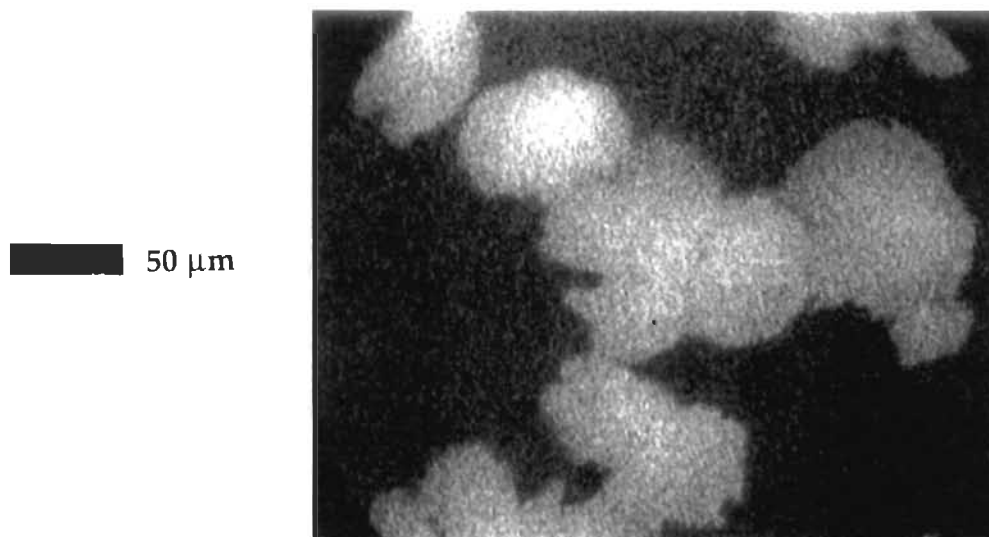


Figure 32 Micrographie de l'hydrolyse du C6C16-PC par la PLA2 après 60 min à une pression de surface de 15 mN/m.

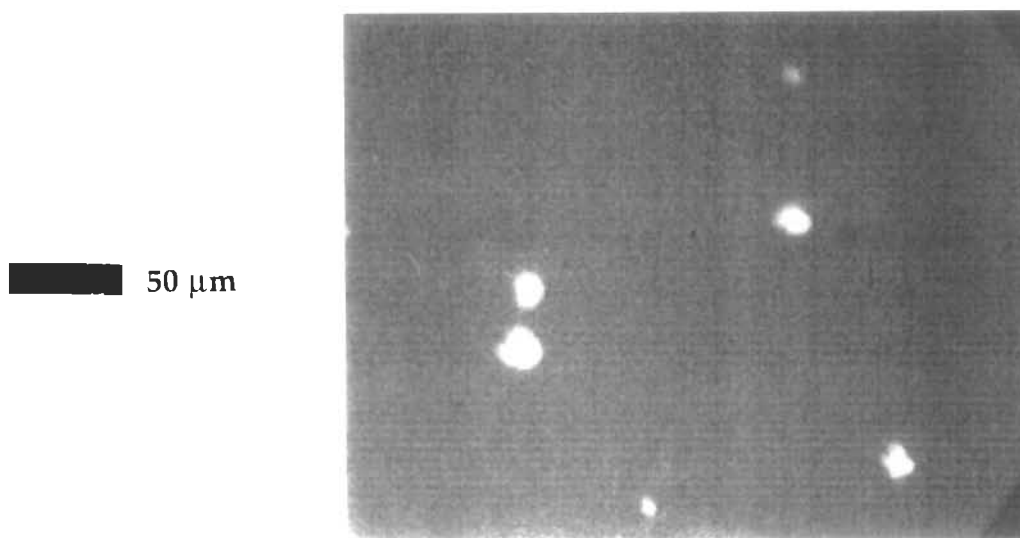


Figure 33 Micrographie de l'hydrolyse du C16C6-PC par la PLA2 après 3 heures à une pression de surface de 15 mN/m.

Plusieurs expériences contrôles ont été effectuées afin d'évaluer la possibilité que les impuretés dans la solution de C16C6-PC soient responsables de la formation du peu de domaines formés dans cette expérience. En particulier, la présence de 6% d'isomères C6C16-PC pourrait être responsable de la formation de domaines dans le cas de l'hydrolyse du C16C6-PC. En tenant compte de ce pourcentage d'impuretés dans l'échantillon de C16C6-PC, une monocouche complètement hydrolysée devrait être composée de 94% de C16Lyso (provenant du C16C6-PC) et 6% d'acide palmitique (provenant du 6% d'impureté: C6C16-PC). L'acide caproïque et le C6Lyso-PC qui sont produits par l'hydrolyse du C16C6-PC et C6C16-PC, respectivement, sont solubilisés dans la sous-phase. Pour vérifier l'effet de ces impuretés sur la formation possible de domaines de PLA2, une monocouche contenant 94% de C16Lyso et 6 % d'acide palmitique a été compressée jusqu'à 15 mN/m et visualisée par microscopie à épifluorescence à l'aide d'un lipide marqué. Les résultats montrent qu'à 15 mN/m, la monocouche demeure complètement fluide et aucun domaine d'acide palmitique ne peut être observé à l'intérieur de la résolution du microscope. De plus, l'injection de PLA2 dans la sous-phase de cette monocouche ne provoque aucune formation de domaines de PLA2, même après 10 h d'incubation (résultats non montrés). À la lumière de ce contrôle, il semble évident que la formation des domaines observés à la figure 33 n'est pas causée par la présence d'impuretés (6% de C6C16-PC) dans la solution de C16C6-PC.

Des expériences identiques ont été réalisées en utilisant le facteur d'activation des plaquettes (PAF, 1-*o*-alkyl-2-acétyl-*sn*-3-phosphatidylcholine). L'hydrolyse du PAF par la PLA2 entraîne la formation d'acide acétique soluble et de lysophosphatidylcholine portant une longue chaîne aliphatique insoluble.

Aucune formation de domaines de PLA2 n'est observée dans cette expérience. De plus, la PLA2 marquée a été injectée dans la sous-phase de monocouches de C16Lyso-PC ou d'acide palmitique. Dans les deux cas, il a été impossible d'observer des domaines de PLA2 ressemblant à ceux observés lors des autres expériences (figures 32 et 33). Les résultats de l'expérience avec le C16Lyso-PC sont identiques à ceux obtenus lors de l'hydrolyse du PAF (i.e. absence de formation de domaines de PLA2). Le film d'acide palmitique pur entraîne quant à lui une liaison relativement homogène de l'enzyme à l'interface comme le montre la figure 34a. La PLA2 adsorbée à ce film ne montre aucune microstructure de forme spécifique, excepté les régions où la monocouche PLA2-acide palmitique est absente. Il est intéressant de noter que ces régions où la PLA2 est absente semblent être dues à des fractures dans la monocouche provoquées par des mouvements de convection à la surface. L'expansion subséquente de cette monocouche à des pressions de surface inférieures à 15 mN/m augmente l'aire occupée par des régions où la PLA2 est absente (figure 34b). Ceci suggère que le film devient de plus en plus fracturé à mesure que l'aire moléculaire augmente. Cette propriété, qui indique un état solide pour ce film, est incompatible avec le type de domaines observés à la figure 32, car ceux-ci ne subissent aucune déformation ou fracture à haute ou faible pression de surface. Maloney et Grainger (1993) et Grainger et al. (1990) ont aussi déterminé que les domaines de PLA2 observés avec divers systèmes de monocouches (mélange DPPC:Lyso-PC:acide gras et hydrolyse de la DPPC, respectivement) étaient très stables, même à très faible pression de surface.

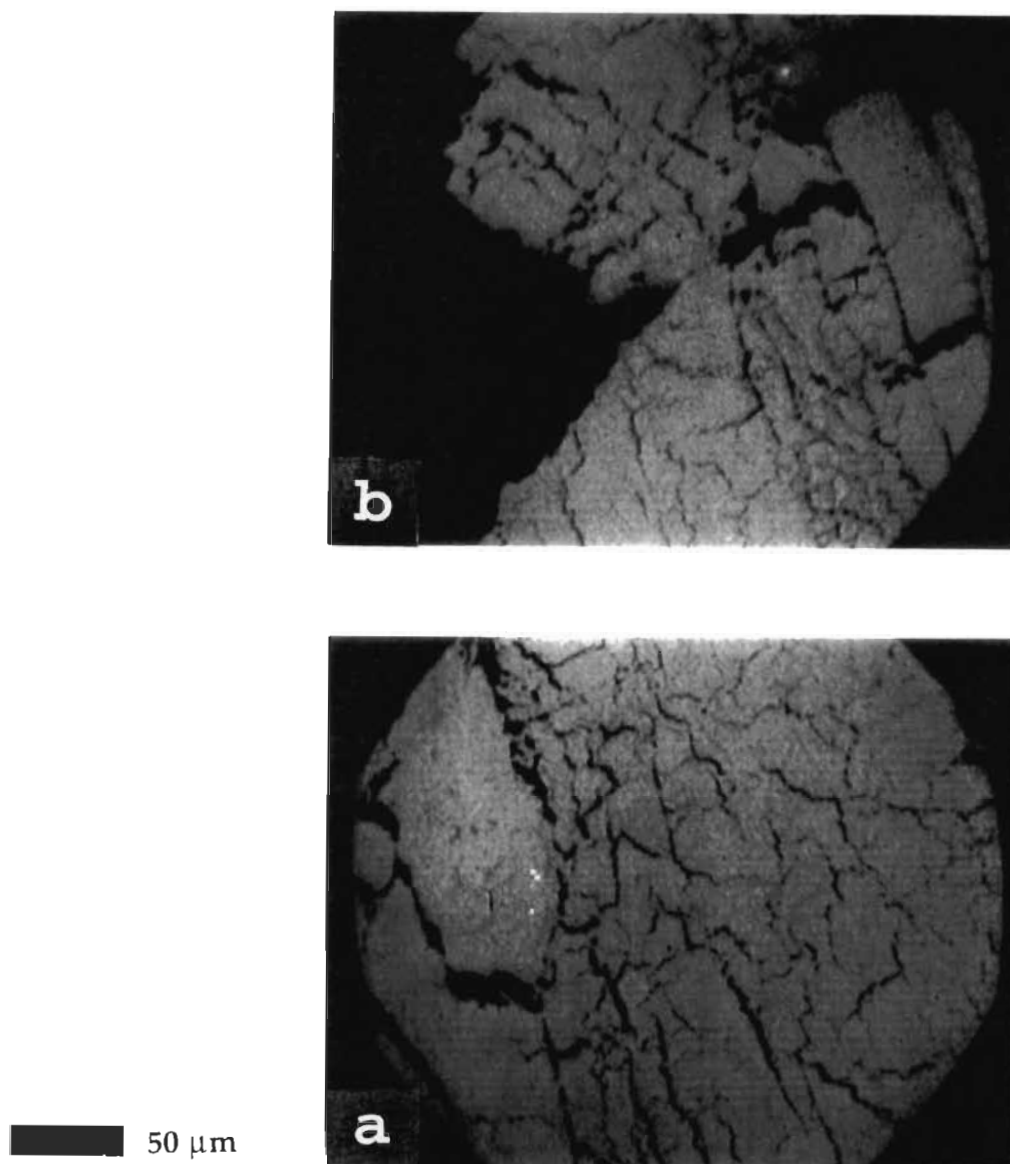


Figure 34 Micrographies obtenues suite à l'injection de PLA2 marquée dans la sous-phase d'un film d'acide palmitique pur à une pression de 15 mN/m (a) avant et (b) après décompression jusqu'à 0 mN/m .

3.3 Discussion

Maloney et Grainger (1993) et Grainger et al. (1989) ont précédemment montré que, dans des conditions appropriées, une quantité critique d'acide gras produite par la PLA2 entraîne la formation de domaines d'acides gras chargés négativement. Il est aussi connu, à partir des données de structure tridimensionnelle obtenues par rayon-X, qu'une région spécifique à la surface de la PLA2 sert à la liaison de l'enzyme aux membranes cellulaires (Dijkstra et al., 1981; Scott et al. 1990). Cette région composée de plusieurs acides aminés chargés positivement serait, selon Grainger et al. (1989), responsable de la liaison de l'enzyme aux acides gras portant une charge négative organisés en microstructure.

Le principal argument en faveur de l'hypothèse de formation de domaines de PLA2 à l'interface air-eau est que les acides gras produits par la PLA2 forment des domaines après l'hydrolyse, ce qui pourrait ainsi entraîner l'adsorption électrostatique de l'enzyme en même temps ou après la formation de ces microstructures dans la monocouche. Conséquemment, si les acides gras sont solubilisés dans la sous-phase de la monocouche pendant l'hydrolyse, l'adsorption de la PLA2 devrait être inhibée. Ceci est réalisé en utilisant un phospholipide (C16C6-PC) dont l'hydrolyse produit un acide gras à 6 carbones qui est soluble dans la sous-phase (voir figure 18). Les valeurs du potentiel de surface et de l'aire moléculaire après l'hydrolyse du C16C6-PC (figure 28) correspondent de très près à celles obtenues pour une monocouche de C16Lyso-PC. Ces résultats sont une preuve directe de la solubilisation rapide de l'acide caproïque (C6) dans la sous-phase pendant l'hydrolyse. Cependant, la microscopie à épifluorescence ne soutient pas complètement cette conclusion.

En effet, dans ce cas, de petits domaines de PLA2 sont observés après une longue période d'incubation après l'hydrolyse (figure 33). Si l'hypothèse de formation de domaines de PLA2 est juste, l'acide caproïque devrait être associé à ces domaines à l'interface. Ce résultat peut être expliqué par l'interaction bien connue entre la PLA2 et les acides gras solubilisés (Cho et al., 1988), qui devrait se produire dans la sous-phase et qui pourrait être responsable de l'adsorption retardée de l'enzyme à l'interface. Ainsi, l'interaction dans la sous-phase de la PLA2 avec l'acide caproïque soluble par un mécanisme d'acylation ou simplement par la formation d'une paire d'ions avec les acides aminés basiques (Cho et al., 1988) devrait rendre l'enzyme beaucoup plus tensioactive. Cette nouvelle propriété de la PLA2 pourrait donc être responsable de la formation des quelques domaines observés dans l'expérience avec le C16C6-PC (figure 33). Bien que le mécanisme précis demeure encore incompris, l'implication de l'acide caproïque dans la formation de ces domaines a été clairement démontrée en éliminant les acides gras de la surface et dans la sous-phase à l'aide de la BSA, ce qui a résulté en l'absence de domaines de PLA2. En effet, l'hydrolyse de monocouches de C16C6-PC par la PLA2 en présence de BSA dans la sous-phase n'a jamais permis d'observer de domaines d'enzymes à l'interface, même après une très longue période de temps. L'ajout de BSA empêche donc la formation de domaines de PLA2. En accord avec l'hypothèse d'adsorption, cet acide gras à 6 carbones produit par la PLA2 devrait être complètement lié par la BSA, ce qui empêcherait toute formation subséquente de domaines d'enzyme.

Lors de l'hydrolyse de monocouches de l'autre lipide asymétrique, le C6C16-PC, les produits de réaction sont le caproyl-lyso-PC (C6Lyso-PC) qui est soluble dans l'eau et l'acide palmitique qui est insoluble dans l'eau (figure 18).

Puisque l'acide palmitique demeure dans la monocouche après l'hydrolyse, les résidus chargés positivement de la PLA2 sont en mesure d'interagir de façon électrostatique avec les groupements carboxylates anioniques des acides gras présents à l'interface. La figure 32 montre les domaines bidimensionnels d'enzyme à l'interface formés suite à cette interaction électrostatique entre les acides gras et la PLA2. Les résultats de la figure 29 montrent que l'aire moléculaire de la monocouche à la fin de l'hydrolyse atteint la valeur attendue pour une monocouche d'acide gras pur, ce qui suggère que ce produit est le seul demeurant à l'interface après l'hydrolyse. Ces résultats suggèrent aussi que la PLA2 liée ne change pas l'aire moléculaire de la monocouche d'acide gras à la fin de l'hydrolyse. Ainsi, la PLA2 ne s'insère pas de façon significative dans la monocouche d'acide gras, contrairement à ce qui est observé quand une monocouche de phospholipides est présente. Dans ce cas, on observe une faible augmentation (< 5 mN/m) de la pression de surface au début de l'hydrolyse. De plus, si on injecte la PLA2 dans la sous-phase d'une monocouche de DPPC juste avant la transition de phase (figure 35) celle-ci provoque la formation de domaines solides de DPPC, ce qui suggère fortement qu'elle s'insère au moins partiellement dans le film lipidique à faible pression de surface pour forcer ce changement d'état physique du DPPC.

Le potentiel de surface à la fin de l'hydrolyse (100 mV, voir figure 30) ne correspond pas à celui d'une monocouche d'acide palmitique pur à cette pression de surface (-30 mV). Pour des monocouches possédant une charge globale neutre comme la phosphatidylcholine et le lysophosphatidylcholine, le potentiel de surface dépend principalement de la composante verticale du moment dipolaire des molécules présentes à l'interface. Ainsi, pour des molécules neutres comme le C6C16-PC, C16C6-PC et le C16Lyso-PC, les dipôles

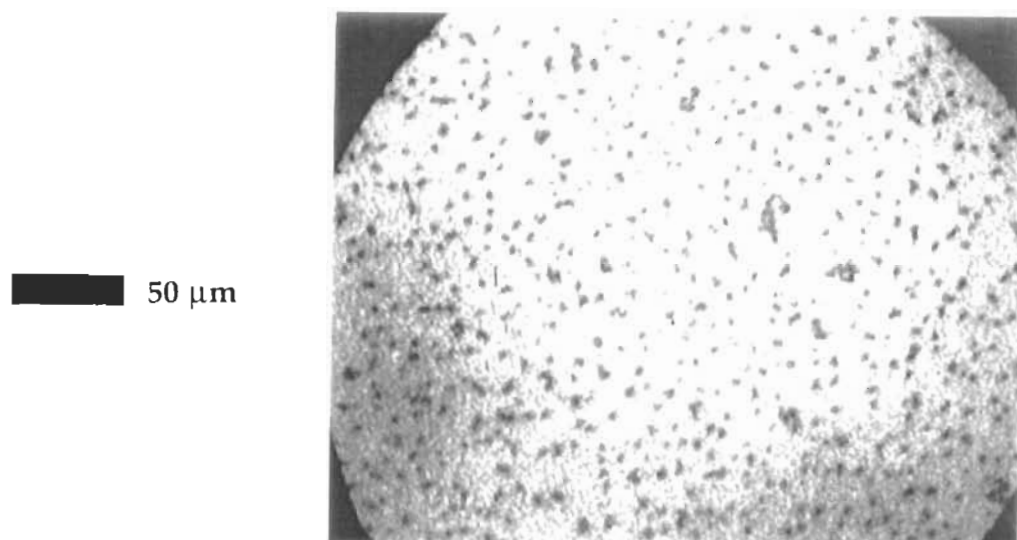


Figure 35 Effet de l'injection de la PLA2 dans la sous-phase d'une monocouche de DPPC (2 mol% de lipide rhodamine) à une pression de surface située juste avant sa transition de phase LE/LC.

suivants contribuent au potentiel de surface: le groupement méthyle terminal et les groupements carbonyles des chaînes grasses, le lien ester entre chaque acide gras et le glycérol, le dipôle entre la charge négative du phosphate et la charge positive de l'amine quaternaire de la choline aussi bien que les molécules d'eau orientées à l'interface (Brockman, 1994).

Une fois l'hydrolyse de la monocouche de C6C16-PC complétée, seulement l'acide gras devrait contribuer au potentiel de surface observé puisque tous les C6Lyso-PC se retrouvent dans la sous-phase comme le démontre la mesure de la variation de l'aire moléculaire. Le groupement carboxylique de l'acide gras présent à l'interface porte alors une charge négative nette au pH utilisé (8.9). Ainsi, dans ce cas, en plus de la contribution de la composante verticale du dipôle résultant, le potentiel de surface résulte aussi de la présence de charges négatives nettes à l'interface (voir équation 4, section 2.1.4) (Brockman, 1994). La grande diminution du potentiel de surface observée entre le début et la fin de l'hydrolyse est due à la disparition des dipôles associés aux C16Lyso-PC et à l'apparition d'une nouvelle espèce (acide palmitique) à l'interface. Il existe cependant une grande différence entre la valeur finale du potentiel de surface (100mV) et la valeur attendue pour un film d'acide palmitique pur (-30 mV) dans ces conditions expérimentales. La seule explication possible pour cette différence est la contribution de la PLA2 présente dans les domaines au potentiel de surface. Comme observé à la figure 32, la PLA2 forme plusieurs domaines bidimensionnels après l'hydrolyse de la monocouche de C6C16-PC. Ainsi, les charges et les dipôles de la PLA2 apportent certainement une contribution non négligeable au potentiel de surface. Si on considère l'aire occupée par ces domaines (voir figure 32) et le nombre de charges et de dipôles présents dans cette enzyme (e.g. le pI de la PLA2 de

N.naja.naja. est de 4.94; Waite, 1978), cette grande différence (130 mV) entre le potentiel de surface à la fin de l'hydrolyse de C6C16-PC et celui d'un film d'acide palmitique pur n'est pas surprenante. La mesure de variation d'aire moléculaire lors de l'hydrolyse du C6C16-PC suggère fortement que l'enzyme ne s'insère pas dans la monocouche alors que les mesures de la variation du potentiel de surface montrent clairement que l'enzyme est bel et bien associée au film. Ces résultats appuient l'idée selon laquelle la liaison interfaciale de la PLA2 au film d'acide palmitique implique des interactions électrostatiques. Il est cependant très difficile de définir de façon précise la nature exacte de cette interaction électrostatique. En effet la présence du calcium dans la sous-phase peut avoir un rôle très important dans la liaison de l'enzyme aux domaines d'acide gras après hydrolyse car il a été montré par Maloney et Grainger (1993) que la présence de cet ion dans la sous-phase était nécessaire à la formation des domaines d'acide gras. On verra au chapitre suivant des évidences de l'implication du calcium dans l'interaction de la PLA2 avec les domaines d'acide gras. Ceci est aussi appuyé par les résultats d'adsorption de la PLA2 sur des films d'acide palmitique pur (figure 34) chargés négativement.

Les expériences avec la BSA dans la sous-phase ont été réalisées avec le C6C16-PC en présence de PLA2 afin de déterminer si elle était capable d'enlever ou de rendre inaccessibles les acides palmitiques présents à l'interface au cours de l'hydrolyse. Les résultats de ces expériences sont tous presque identiques à ceux de la figure 32. Il est, en effet, possible d'observer dans ces expériences un grand nombre de domaines de PLA2 malgré la présence de BSA. Il semble donc que la BSA ne peut éliminer les acides gras insolubles présents à l'interface. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent que la BSA est incapable de lier des acides gras à longues chaînes à l'interface

(Kupferberg et al., 1981). Ainsi, le fait que la BSA soit incapable d'enlever l'acide palmitique de l'interface la rend inefficace à empêcher la formation de domaines dans le cas de l'hydrolyse du C6C16-PC.

Le but de ce chapitre était de comprendre le mécanisme de formation des domaines de PLA2 lors de l'hydrolyse de monocouches de phospholipides. Les résultats présentés montrent que la solubilisation de l'acide gras lors de l'hydrolyse du C16C6-PC empêche la formation de domaines de PLA2 à l'interface. Ceci démontre de façon claire et directe que l'acide gras joue un rôle primordial dans la formation de domaines au niveau de la monocouche et dans la liaison subséquente de l'enzyme à ces domaines composés principalement d'acides gras. De plus, les expériences faites avec le phospholipide asymétrique C6C16-PC montrent qu'il est possible d'observer la formation de domaines de PLA2 à l'interface même si le lysophosphatidylcholine est solubilisé dans la sous-phase. Ceci suggère fortement que le lyso-PC n'est pas nécessaire à la formation des domaines de PLA2. Il se peut cependant, comme on le verra ci-dessous, que la Lyso-PC soit essentielle pour produire la forme particulière des domaines de PLA2 produits dans le cas de l'hydrolyse de monocouche de DPPC (voir figure 13).

Le travail de Maloney et Grainger (1993) a montré qu'un mélange de DPPC/C16Lyso-PC/acide palmitique (0.2:1:1) en absence de PLA2 formait des domaines lipidiques dont la morphologie était très semblable à celle des domaines de PLA2 observés dans des expériences de Grainger et al. (1989). Ces résultats suggèrent que les domaines de PLA2 se forment suite à l'adsorption de la PLA2 à ces domaines d'acide gras. Il est impossible de savoir, à partir des travaux de Maloney et Grainger (1993), si les domaines lipidiques contiennent

aussi de la DPPC ou de la Lyso-PC. Cependant, ces domaines observés par microscopie à épifluorescence apparaissent grises, ce qui indique que la sonde est présente dans ces régions. Cette observation a amené Maloney et Grainger (1993) à proposer que les lipides comme la DPPC et la C16Lyso-PC sont probablement aussi présentes. D'autre part, Reichert et al. (1992) ont proposé, à partir d'expériences faites avec une monocouche composée de domaines de lipides cristallins chargés négativement (acide diacétylénique carboxylique) dans une matrice fluide de DPPC, que la présence de DPPC était nécessaire à la reconnaissance de la monocouche par l'enzyme.

Les résultats présentés dans le présent chapitre semblent a priori en désaccord avec ceux de Maloney et Grainger (1993) et Reichert et al. (1992) car ils suggèrent, dans le cas de l'hydrolyse du C6C16-PC, que ni le lysophospholipide et ni la C6C16-PC ne sont nécessaires à la formation de domaines de PLA2 puisque ces deux lipides sont supposés absents de la monocouche à la fin de l'hydrolyse. Il est peut-être possible de concilier ces résultats avec ceux de Maloney et Grainger (1993) et Reichert et al. (1992) si on tient compte de la morphologie et de l'état physique des domaines de PLA2. Dans un premier temps, il est possible d'expliquer le résultat négatif de l'adsorption de la PLA2 sur les domaines cristallins d'acides diacétyléniques carboxyliques (Reichert et al., 1992) par l'effet de leur état physique sur l'adsorption de la PLA2. En effet, il est tout à fait possible que la PLA2 ne puisse s'adsorber à une monocouche dans l'état solide comme dans le cas de ces domaines cristallins. Une simple expérience contrôle faite avec une monocouche mixte composée de domaines dans l'état solide condensé d'acide distéaroylphosphatidique (DSPA) chargé négativement dans une matrice fluide neutre de dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) ne montre aucune adsorption de la PLA2 pour les domaines de DSPA

dans l'état liquide-condensé (figure 36). Ainsi, même si le DSPA est chargé négativement et même s'il s'agit d'un phospholipide hydrolysable par la PLA2 (i.e. que la PLA2 peut reconnaître le DSPA à l'interface) il est impossible d'observer la liaison de l'enzyme à ces domaines de DSPA. L'état physique semble donc être un facteur primordial pour la liaison de la PLA2 à un film lipidique et il est tout à fait probable que ce facteur soit responsable des résultats négatifs obtenus par Reichert et al. (1992). Cette hypothèse est aussi tout à fait compatible avec les résultats de Maloney et Grainger (1993) car, dans leurs expériences, les domaines d'acides gras ne sont pas cristallines et permettent ainsi l'adsorption de la PLA2.

La présence de lysophospholipides ou de DPPC, même si elle n'est pas essentielle, peut fournir une bonne explication pour la morphologie des domaines de PLA2 observés pour les différents systèmes lipidiques. En effet, on note que la morphologie des domaines de PLA2 observés lors de l'hydrolyse du DPPC (figure 13) et du C6C16-PC (figure 32) est très différente. L'hydrolyse du DPPC (Grainger et al., 1989) produit des domaines en forme de fève alors que des domaines amorphes sont observés dans le cas de l'hydrolyse du C6C16-PC. On observe aussi la morphologie en forme de fève dans le cas des des mélanges utilisés par Maloney et Grainger (1993) qui comprennent 10% de DPPC. Dans l'état solide-condensé, le DPPC est bien connu pour produire des domaines de forme chirale (Mc Connell et al., 1984). La figure 37 montre des domaines solide de DPPC de forme chirale obtenus lors d'une compression rapide du film alors que les domaines de la figure 13 ont été obtenus en comprimant lentement celui-ci. Cette forme de domaines est analogue à celle observée lors de la formation des domaines de PLA2 dans les expériences de Grainger et al. (1989) et Maloney et Grainger. (1993). Il est donc possible que cette propriété du DPPC

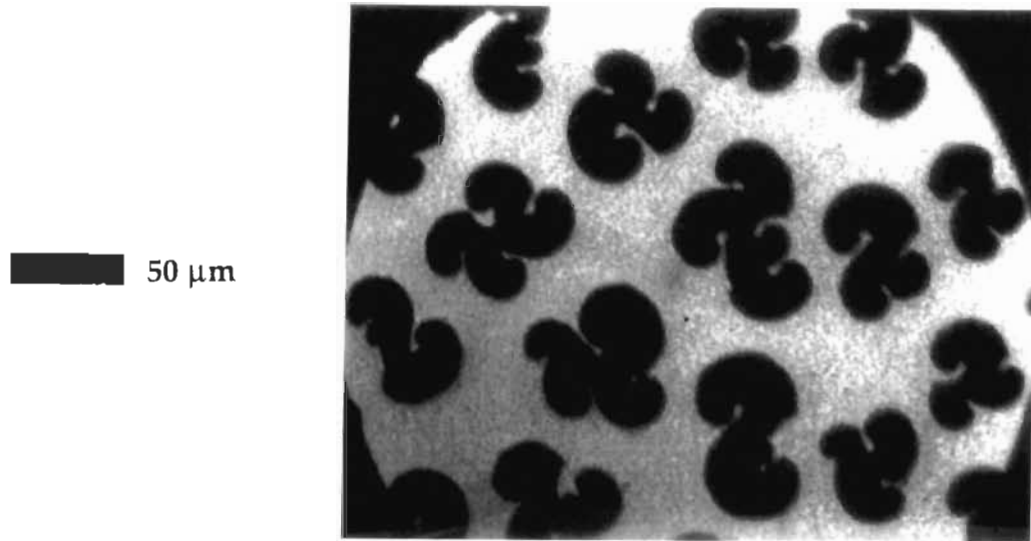


Figure 37 Domaines chiraux de DPPC dans la transition de phase LE/LC.

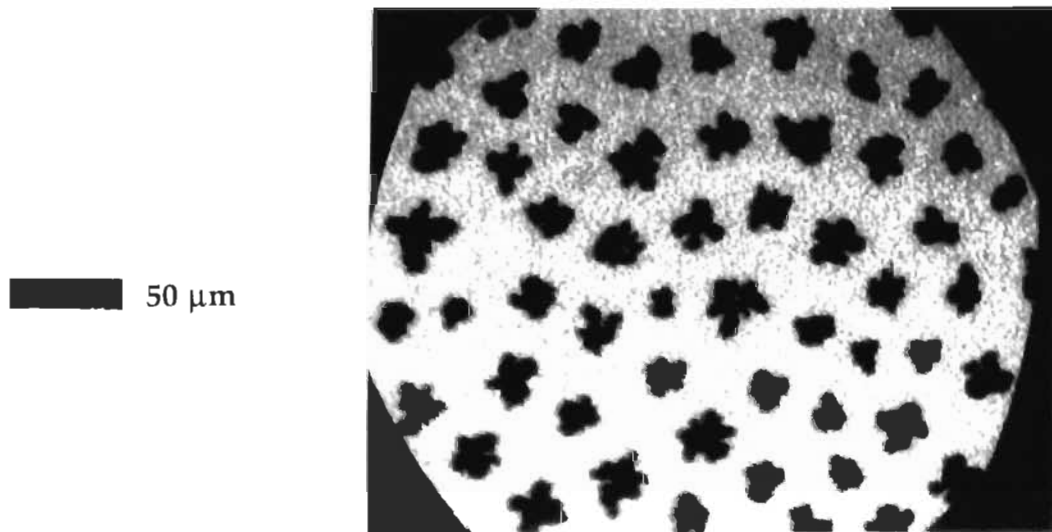


Figure 36 Injection de PLA2 marquée dans la sous-phase d'une monocouche composée de DSPA dans la phase liquide-condensé dans une matrice fluide de DOPC en phase liquide-expansé.

(probablement aussi celle du C16Lyso-PC) soit responsable de la forme chirale des domaines de PLA2 si un de ces deux lipides est présent au niveau de la monocouche. Ces lipides pourraient, en quelque sorte servir de gabarit dans la formation des domaines de PLA2. À la fin de l'hydrolyse du C6C16-PC, ce phospholipide et le C6Lyso-PC sont tous deux absents de l'interface. Dans ce cas, les domaines de PLA2 produits sont de forme plutôt irrégulière et amorphe. Ainsi, on peut supposer que la PLA2 forme des domaines à l'interface sans la morphologie imposée par le comportement chirale de la DPPC ou du lysophospholipide puisque ceux-ci sont absents de la monocouche à la fin de l'hydrolyse. L'expérience contrôle avec le film d'acide palmitique pur appuie cette suggestion car, dans ce cas, aucune forme chirale n'est observée. Ainsi, la présence de phospholipides chiraux à l'interface semble contrôler la morphologie des domaines de PLA2.

CHAPITRE 4

ÉTUDE DE LA COMPOSITION DES DOMAINES DE PLA2 EN MONOCOUCHE À L'INTERFACE AIR-EAU: MESURES PAR PM-IRRAS

4.1 Introduction

Il existe plusieurs façons de mesurer l'activité de la PLA2 sur des monocouches de phospholipides à l'interface air-eau (pour une revue récente, voir Piéroni et al., 1990): la mesure de la variation de l'aire moléculaire, de la pression de surface ainsi que du potentiel de surface en fonction du temps. On peut ainsi obtenir des informations sur la cinétique de l'hydrolyse de monocouches de phospholipides comme démontré aux chapitres 3 et 6. La microscopie à épifluorescence permet, quant à elle, d'obtenir des informations de nature macroscopique de l'action de l'enzyme sur des domaines de phospholipides dans l'état solide-condensé à l'interface air-eau. Récemment, la spectroscopie infrarouge par réflexion (IRRAS) a aussi été utilisée pour étudier ce processus d'hydrolyse enzymatique *in situ* à l'interface air-eau (Gericke et Hühnerfuss, 1994a). Cependant, l'absorption de l'eau, dans la région de 1600 cm^{-1} ne fut pas compensée de façon satisfaisante dans leurs spectres, de sorte qu'il a été impossible pour les auteurs de faire une attribution concluante de toutes les bandes infrarouges observées. La mesure de spectres par PM-IRRAS à l'interface air-eau permet d'éliminer, de façon très efficace, la contribution de l'eau dans le spectre infrarouge. En effet, d'autres auteurs ont montré qu'il était possible de mesurer les spectres PM-IRRAS d'acides gras (Blaudez et al., 1993 et

1994), de phospholipides et de mélanges phospholipides-peptides (Cornut et al., 1996) avec très peu de contribution de la vapeur d'eau ou l'eau de la sous-phase. Dans le présent chapitre, la technique de PM-IRRAS a été utilisée pour étudier l'hydrolyse de monocouche de DPPC et confirmer les résultats du chapitre 3. De plus, l'attribution des bandes observées lors de l'hydrolyse du DPPC a été réalisée de façon précise en mesurant les spectres PM-IRRAS des produits d'hydrolyse purs (acide palmitique et C16lyso-PC) ainsi que les spectres des phospholipides asymétriques (C6C16-PC et C16C6-PC) utilisés dans le chapitre 3 avant et après leur hydrolyse par la PLA2 (Grandbois et al., 1996a).

La technique de PM-IRRAS a aussi été utilisée pour obtenir des informations sur l'organisation des domaines de PLA2 observés après l'hydrolyse de monocouches de DPPC ainsi que sur l'implication du calcium dans ce processus. Grainger et al. (1989 et 1990) ont montré que l'hydrolyse de monocouches de DPPC entraînait la formation de domaines de PLA2 à l'interface (voir figure 13). Dans le chapitre 3, il a été montré que la présence d'acide gras portant une charge négative était essentielle à la formation de ces domaines d'enzymes à l'interface air-eau. Ce processus ferait suite à la formation des domaines d'acides gras induite par le calcium (Maloney et Grainger, 1993). Ces études laissent néanmoins non résolue la question de l'organisation de la PLA2 et du calcium dans ces domaines. Des résultats préliminaires, obtenus par microscopie électronique de domaines d'enzymes transférés sur grille de carbone suggèrent que la PLA2 est arrangée sous forme de cristal bidimensionnel (Maloney et al., 1995b). La technique de PM-IRRAS a donc été utilisée pour obtenir des informations concernant l'arrangement de la PLA2 et du calcium dans ces domaines. Les spectres PM-IRRAS des lipides asymétrique, de l'acide palmitique et du lyso-PC ont été réalisés à une pression

de 7 mN/m afin de pouvoir les comparer avec les spectres PM-IRRAS obtenues lors de l'hydrolyse de la DPPC dans la transition de phase LE/LC (7 mN/m).

4.2 Résultats

4.2.1 Hydrolyse de la DPPC par la PLA2

La figure 38 montre les spectres PM-IRRAS de l'hydrolyse par la PLA2 d'une monocouche de DPPC à l'interface air-eau, mesurés dans la région de 1800-900 cm^{-1} à différents temps d'hydrolyse. Les trois bandes IR les plus importantes dans le spectre du DPPC avant hydrolyse (spectre a) ont été attribuées à l'élongation $\nu_{\text{C=O}}$ ester à 1733 cm^{-1} , à la déformation δ_{CH_2} à 1468 cm^{-1} et à la vibration $\nu_{\text{aP=O}}$ à 1228 cm^{-1} . Le fait que ces bandes sont orientées positivement par rapport à la ligne de base indique que les moments de transition de leurs vibrations sont orientés préférentiellement dans le plan de l'interface. L'attribution de ces bandes IR est en accord avec celle de Gericke et Hühnerfuss (1994a) et Cornut et al. (1996). La présence d'une large bande IR négative dans la région 1700-1600 cm^{-1} est principalement due à un effet optique lié à la structuration de l'eau au niveau des têtes polaires des phospholipides (Blaudez, 1993; Blaudez et al., 1994)

L'hydrolyse de monocouches de DPPC par la PLA2 entraîne une diminution de l'intensité et un élargissement de la bande des C=O ester à 1733 cm^{-1} (spectres b-f). La diminution de cette bande, qui a aussi été observée par Gericke et Hühnerfuss (1994a), est due à l'hydrolyse du lien sn-2 acyle ester du DPPC par la PLA2 (voir figure 6). La bande C=O ester résiduelle à 1733 cm^{-1} à la

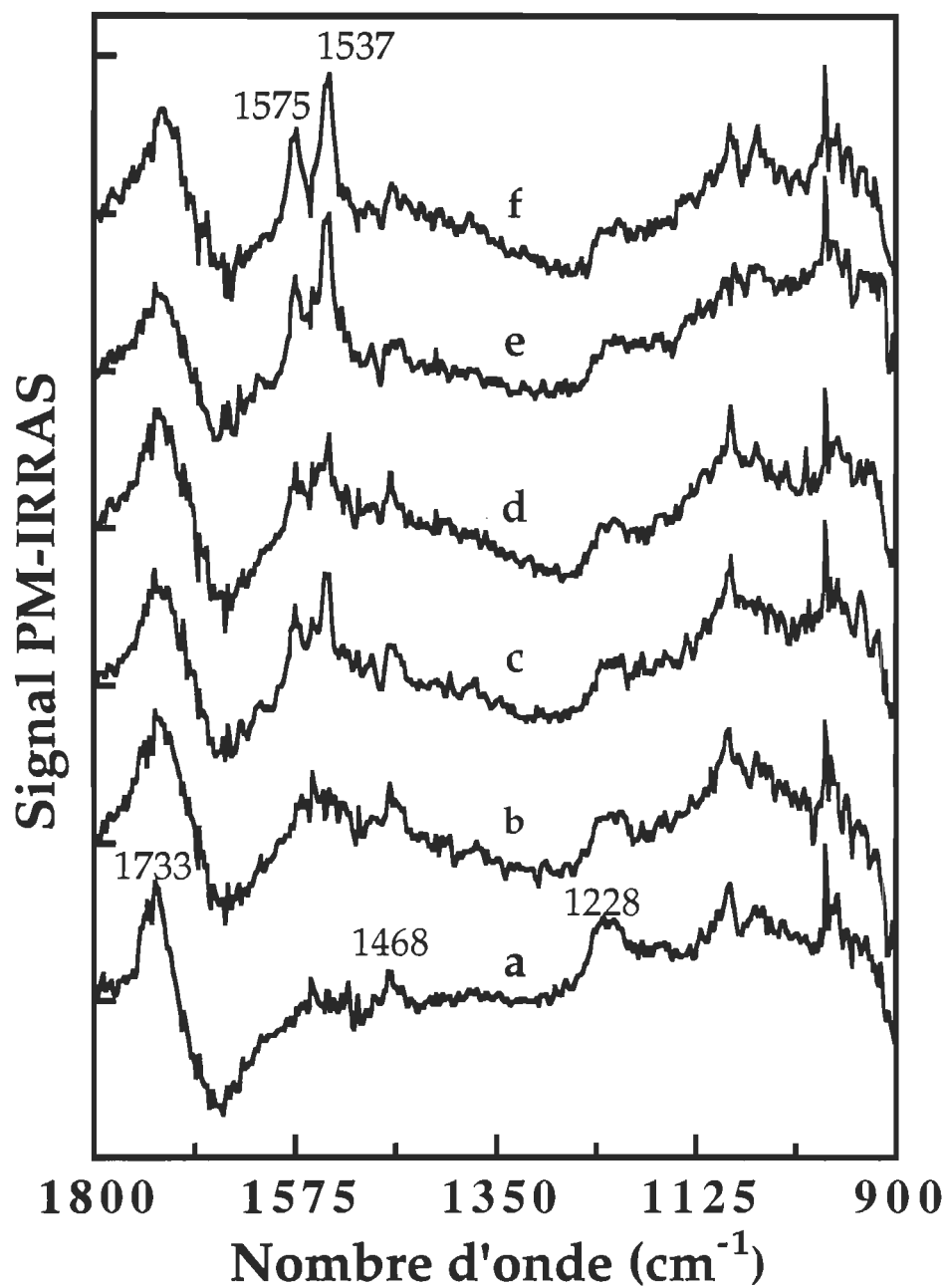


Figure 38 Spectres PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC par la PLA2 à 7 mN/m dans la transition de phase LE/LC. (a) Monocouche de DPPC pure et (b) 10 min, (c) 25 min, (d) 50 min, (e) 70 min, (f) 90 min après l'injection de la PLA2.

fin de l'hydrolyse (spectre f) est due au lien sn-1 acyle ester du produit d'hydrolyse C16lyso-PC. L'élargissement de cette bande peut être interprété par une augmentation du désordre au niveau de la monocouche pendant l'hydrolyse. Cette interprétation est en accord avec les travaux de Cornut et al. (1996) qui notent que la bande des C=O ester est de plus en plus étroite à mesure que l'on comprime une monocouche de DMPC et donc qu'on favorise la formation de domaines dans l'état solide-condensé avec des chaînes aliphatiques en conformation tout-trans.

D'autres changements importants sont observés sur le spectre pendant l'hydrolyse de la monocouche par la PLA2. En effet, on peut voir sur la figure 38 (spectres b-f) l'apparition de deux nouvelles bandes à 1537 et 1575 cm^{-1} . Gericke et Hünerfuss (1994a) ont aussi observé, après l'hydrolyse par la PLA2, la présence de deux nouvelles bandes à 1542 cm^{-1} et à 1578 cm^{-1} ainsi qu'une autre bande à 1562 cm^{-1} . Cependant, leurs spectres étaient fortement contaminés par l'absorption de la vapeur d'eau dans cette région de telle sorte que l'attribution de ces bandes fut très difficile. Les auteurs ont néanmoins attribué les bandes à 1562 et 1542 cm^{-1} à la vibration antisymétrique du carboxylate de l'acide gras, alors que la bande à 1578 cm^{-1} a été attribuée à la vibration $\nu_a\text{COO}^-$ du groupe β -carboxylate des résidus d'acide aspartique de la PLA2. Dans le présent travail, une attribution précise de ces bandes IR a été réalisée en mesurant les spectres PM-IRRAS des produits d'hydrolyse individuels (C16lyso-PC et acide palmitique) et des phospholipides asymétriques (C6C16-PC et C16C6-PC) avant et après leur hydrolyse par la PLA2. L'utilisation de ces phospholipides asymétriques permet de mesurer un spectre PM-IRRAS après hydrolyse d'une monocouche contenant seulement un des deux produits d'hydrolyse (voir chapitre 3). En effet, avec le C6C16-PC seul l'acide palmitique reste à l'interface

tandis qu'avec le C16C6-PC, seul le C16lyso-PC demeure dans la monocouche. Ainsi, il nous est possible d'attribuer précisément la position des bandes dans des conditions normales d'hydrolyse par la PLA2.

4.2.2 Hydrolyse du C16C6-PC

Le spectre PM-IRRAS d'une monocouche de C16lyso-PC pure est présenté à la figure 39. Ce spectre est très similaire à celui d'une monocouche de DPPC avant hydrolyse (figure 38, spectre a). En effet, on peut voir sur ce spectre, comme pour le spectre de la DPPC, la bande des $\nu_{C=O}$ ester à 1732 cm^{-1} , celle de la déformation δ_{CH_2} à 1468 cm^{-1} et celle de la vibration $\nu_{aP=O}$ à 1228 cm^{-1} . Parallèlement à ces résultats, des mesures avec le phospholipide asymétrique C16C6-PC ont apporté des informations supplémentaires sur le spectre du C16Lyso-PC comme produit d'hydrolyse. En effet, l'hydrolyse du C16C6-PC par la PLA2 produit un acide gras à six carbones (acide caproïque) soluble dans la sous-phase et un C16lyso-PC insoluble. La figure 40 montre le spectre PM-IRRAS avant (spectre a) et après (spectre b) l'hydrolyse de la monocouche de C16C6-PC par la PLA2. La seule différence entre ces deux spectres est la diminution d'intensité de la bande des $C=O$ ester à 1733 cm^{-1} . Comme dans le cas de l'hydrolyse du DPPC, cette diminution est due à l'hydrolyse du lien sn-2 acyle ester par la PLA2. Ainsi, l'absence des bandes à 1575 et 1537 cm^{-1} sur le spectre du C16C6-PC après hydrolyse est due à la solubilisation de l'acide caproïque dans la sous-phase. La similarité entre les spectres du C16Lyso-PC (figure 39), C16C6-PC après l'hydrolyse (figure 40, spectre b) et DPPC (figure 38, spectre a) suggère que les bandes observées dans la région $1530\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ dans le spectre de la DPPC après hydrolyse par la PLA2, ne peuvent être attribuées à la

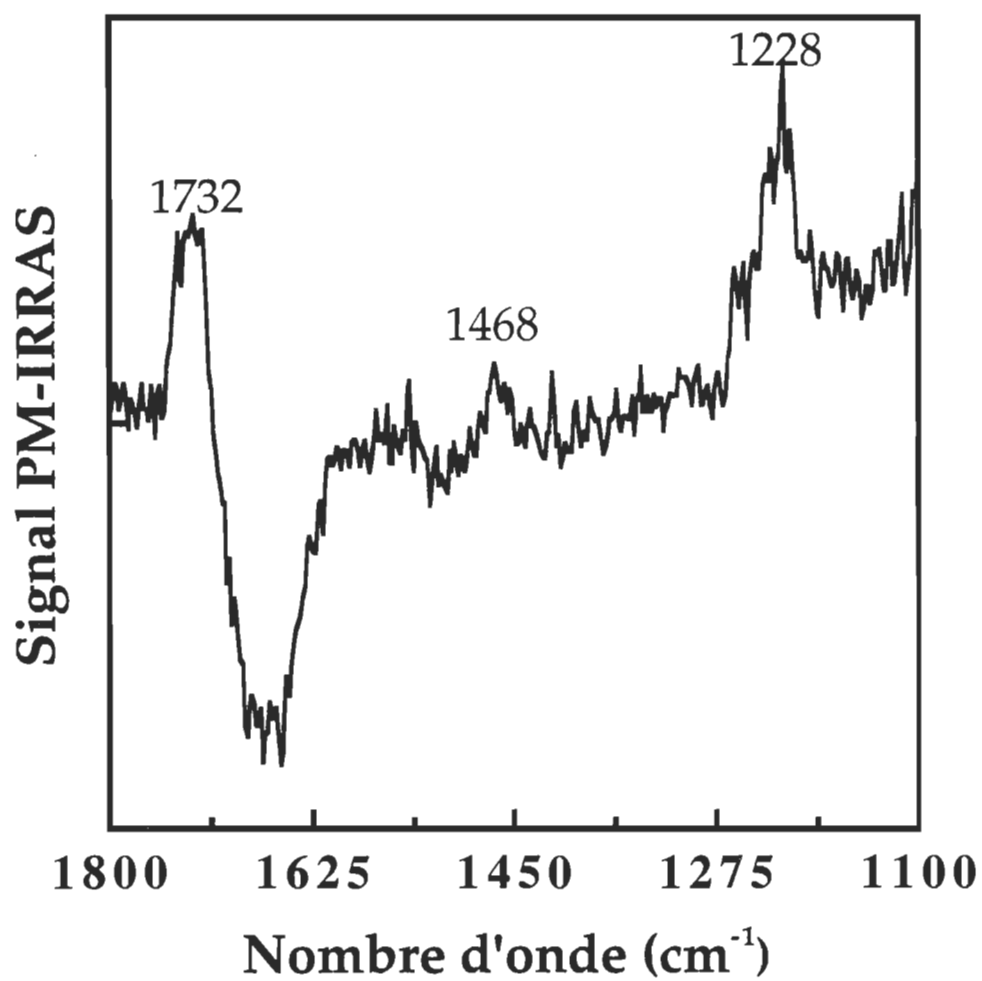


Figure 39 Spectre PM-IRRAS d'une monocouche de C16Lyso-PC pure à 7 mN/m.

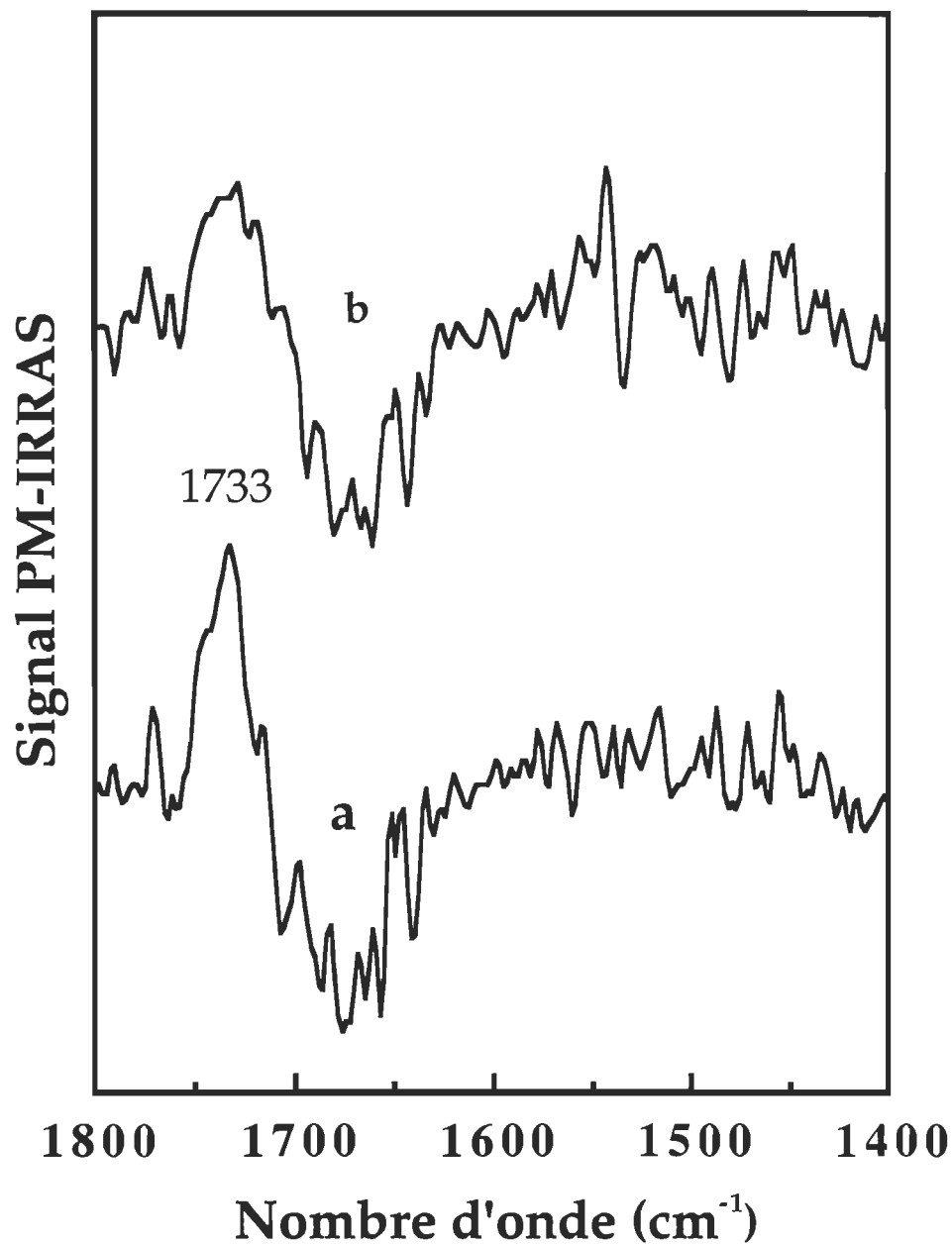


Figure 40 Spectre PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de C16C6-PC par la PLA2 à 7 mN/m. (a) Monocouche de C16C6-PC pure avant l'injection de l'enzyme et (b) après 60 min d'hydrolyse par la PLA2.

formation de la C16Lyso-PC ou aux acides aminés de la PLA2. Ces résultats confirment aussi nos résultats d'aire moléculaire et de potentiel de surface de l'hydrolyse du C16C6-PC qui montrent l'absence d'acide gras dans ce film après hydrolyse par la PLA2 (voir chapitre 3).

4.2.3 Hydrolyse de la C6C16-PC

Le spectre de l'acide palmitique pur est présenté à la figure 41. Ce spectre montre deux bandes intenses à 1538 et 1573 cm^{-1} et une bande correspondant à la vibration δCH_2 à 1468 cm^{-1} . Il existe une très bonne corrélation entre la position de ces bandes et celles observées dans le spectre du DPPC après hydrolyse. En effet, les bandes à 1538 et 1573 cm^{-1} observées dans le spectre de l'acide palmitique à la figure 41 correspondent très bien avec les bandes 1537 et 1575 cm^{-1} du spectre du DPPC après hydrolyse (figure 34, spectre f). L'utilisation du lipide asymétrique C6C16-PC fournit des informations additionnelles sur ces bandes. L'hydrolyse du C6C16-PC produit un acide gras insoluble (acide palmitique, C16) et un C6Lyso-PC soluble. La figure 42 montre le spectre PM-IRRAS avant et après l'hydrolyse complète d'une monocouche de C6C16-PC. Le spectre du C6C16-PC avant hydrolyse (spectre a) montre une bande des C=O ester à 1731 cm^{-1} comme pour le spectre du DPPC avant hydrolyse (figure 38, spectre a). À la fin de l'hydrolyse (figure 42, spectre b), cette bande disparaît presque complètement à cause de la solubilisation du C6Lyso-PC dans la sous-phase. De plus, à la fin de l'hydrolyse, deux nouvelles bandes à 1537 et 1575 cm^{-1} sont observées sur ce spectre. La position de ces bandes correspond très bien avec celle du doublet observé dans le spectre du DPPC après hydrolyse (1537 et 1575 cm^{-1} , spectre f, figure 38). Ces résultats confirment les résultats du chapitre

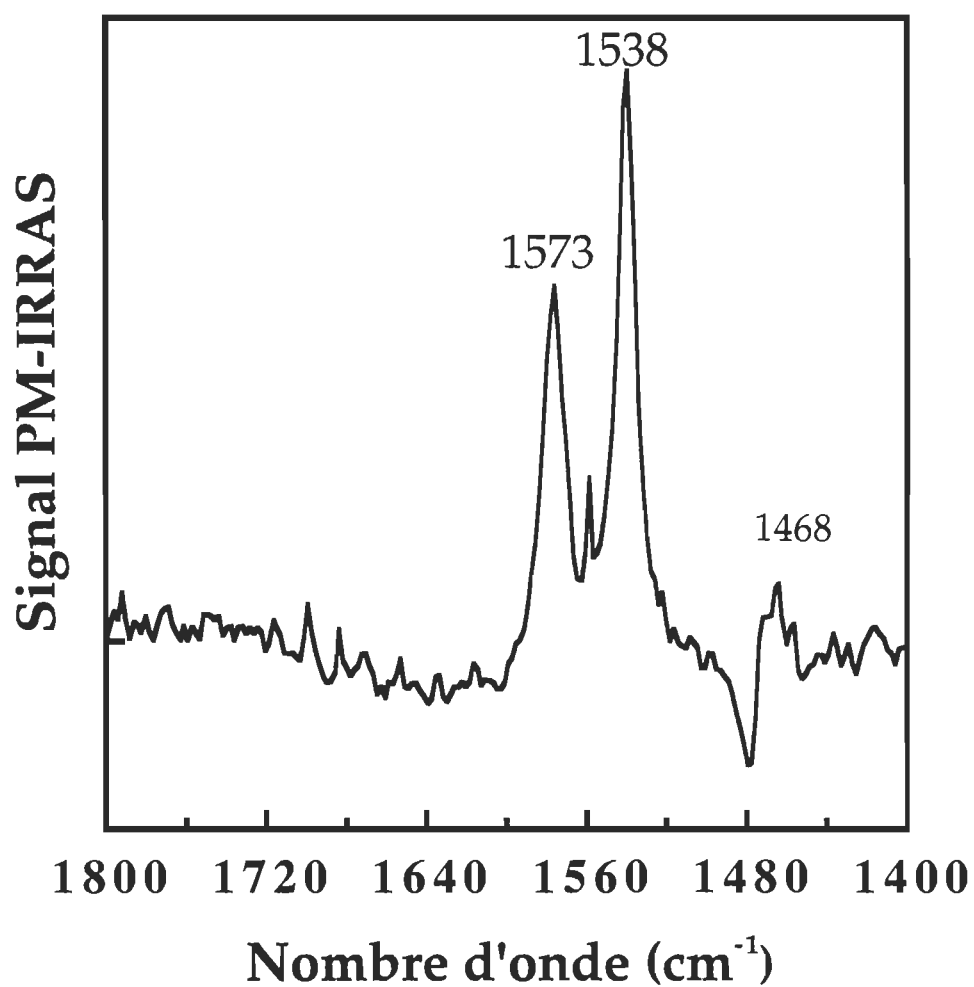


Figure 41 Spectre PM-IRRAS d'une monocouche d'acide palmitique pur à 7 mN/m.

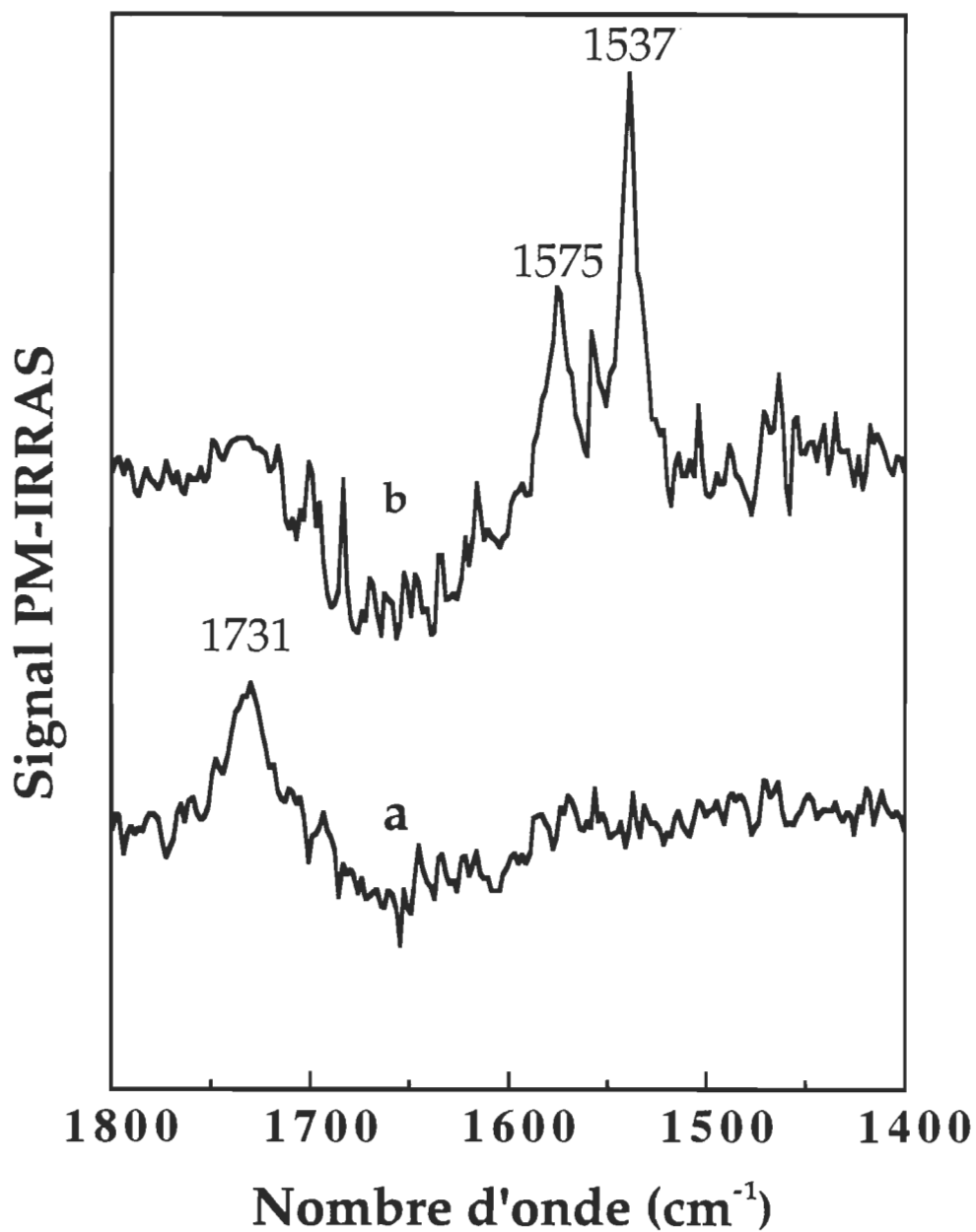


Figure 42 Spectre PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de C6C16-PC par la PLA2 à 7 mN/m. (a) Monocouche de C6C16-PC pure avant l'injection de l'enzyme et (b) après 60 min d'hydrolyse par la PLA2.

3 qui montrent clairement la présence d'acides gras après l'hydrolyse de cette monocouche par la PLA2 (voir figure 29).

4.2.4 Spectres de la PLA2 à l'interface

Les spectres PM-IRRAS présentés aux figures 38, 40 et 42 ne permettent pas de détecter la présence des bandes amide I et II de la PLA2 par la soustraction du spectre en présence de PLA2 par le spectre de la monocouche lipidique en absence de l'enzyme. Ceci est dû au fait que la composition lipidique du film après hydrolyse est dramatiquement différente de celle avant hydrolyse, ce qui implique que les bandes infrarouges dues aux lipides sont très différentes. Cependant, Maloney et Grainger (1993) et Reichert et al. (1992) ont montré qu'il était possible de former spontanément des domaines de PLA2 en injectant cette enzyme dans la sous-phase d'une monocouche d'un mélange ternaire de DPPC, lyso-PC et acide gras. Ainsi, le spectre infrarouge de la PLA2 à l'interface a été obtenu en injectant cette enzyme dans la sous-phase d'une monocouche mixte de DPPC:C16Lyso-PC:acide palmitique (20:40:40) qui mime un film de DPPC partiellement hydrolysé. Il est évident que durant le temps de mesure du spectre PM-IRRAS après l'injection de la PLA2, le spectre du mélange lipidique a pu changer légèrement parce que la DPPC a pu être partiellement hydrolysée. Cependant, le spectre de différence ne montre aucune bande typique des lipides. La présence des bandes amide I et II de la PLA2 a donc été révélée en soustrayant au spectre de la monocouche du mélange lipidique en présence de PLA2, le spectre du mélange lipidique seul. La figure 43a montre ce spectre de différence 1 pour 1 une heure après l'injection de la PLA2. Ce spectre montre deux bandes centrées à 1662 et 1535 cm^{-1} attribuées, respectivement, aux bandes

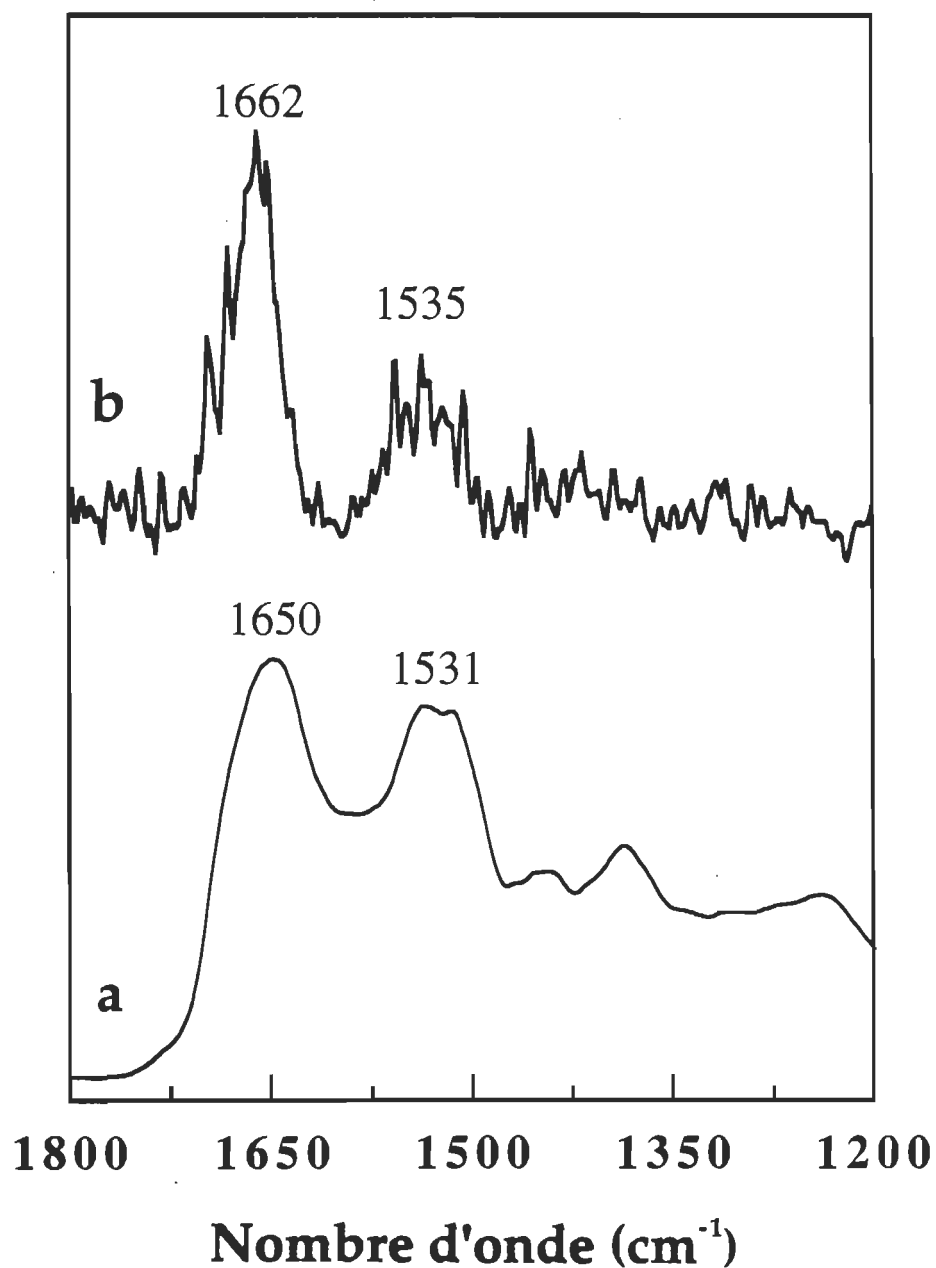


Figure 43 Spectre IR de la PLA2 dans différents états. (a) spectre d'absorption dans l'état solide (spectre de poudre) et (b) spectre de différence obtenu en soustrayant le spectre PM-IRRAS de la PLA2 adsorbée à une monocouche mixte (DPPC : acide palmitique : C16Lyso-PC, 20:40:40) du spectre PM-IRRAS de cette monocouche mixte en absence de PLA2.

amide I et II de la PLA2. L'observation des bandes amide I et II de la PLA2 est une preuve directe supplémentaire de la présence de l'enzyme au niveau de la monocouche qui appuie les données de potentiel de surface et de microscopie à épifluorescence présentées au chapitre 3 et démontrent que l'enzyme est associée fortement au film lipidique suite à l'observation des domaines de PLA2.

La spectroscopie PM-IRRAS a été montrée comme étant très sensible à l'organisation et à l'orientation des hélices-alpha à l'interface air-eau (Cornut et al. 1996). Dans cette étude, il a été démontré que le rapport des intensités intégrées des bandes amide I et II permettait d'estimer l'orientation et l'organisation de peptides à l'interface. Ce rapport d'intensité est une façon d'étudier l'orientation et l'organisation de protéines par la spectroscopie PM-IRRAS. De façon générale, le rapport d'intensité de ces bandes devrait être différent pour une protéine organisée de façon isotrope (protéine en poudre ou en solution) en comparaison au rapport mesuré par PM-IRRAS pour une protéine organisée à l'interface air-eau. Le ratio entre les bandes amides I et II a donc été utilisé afin de déterminer l'orientation de la PLA2. Dans une étude plus générale, Kenneth et Griffiths (1993) ont mesuré des spectres IR de protéines dans différentes conditions expérimentales par réflexion totale atténuée (ATR), réflexion diffuse (DR), pastille de KBr et en solution dans l'eau. Le rapport des bandes amide I et II a été utilisé afin de montrer que la protéine adoptait différentes configurations en fonction des conditions expérimentales et de la technique de mesure. Il faut cependant être très prudent dans la comparaison des rapports entre les bandes amide I et II car les différences peuvent être dues à un changement de structure secondaire de la protéine (Kenneth et Griffiths, 1993) ou à un effet de dichroïsme des bandes

amide I et II. Ce dichroïsme est en effet très présent en ATR et en PM-IRRAS. Il faut donc être très prudent dans l'interprétation des différences observées dans le rapport d'intensité des bandes amide I et II car il est très difficile de discriminer ces deux effets. Le spectre PM-IRRAS de la PLA2 à l'interface air-eau (figure 43, spectre b) permet de calculer un rapport entre les bandes amide I et II de 1.84, ce qui est très près de la valeur de 2 obtenue pour le spectre isotrope de la PLA2 en poudre (figure 43, spectre a). Ce résultat suggère que la PLA2 possède une organisation isotrope dans ces domaines à l'interface air-eau et que la PLA2 ne subit aucun changement de structure secondaire suite à son adsorption au film lipidique. Ces conclusions doivent être considérées à titre indicatif seulement car les spectres PM-IRRAS obtenus sont très bruyants. De plus, en considérant l'état physique des échantillons pour les mesures des spectres à l'interface air-eau et en poudre, il est très difficile de commenter la différence de 12 cm^{-1} dans la bande amide I de ces deux spectres.

4.3 Discussion

À pH alcalin, l'acide carboxylique des acides gras est déprotoné et forme un palmitate en présence de sel. Les résultats des figures 38 à 42 suggèrent fortement que le doublet observé à 1537 et 1575 cm^{-1} dans le spectre du DPPC après hydrolyse (figure 38, spectre f) peut seulement être attribué à la formation d'un sel d'acide palmitique. Cependant, ces vibrations pourraient aussi être attribuées, en principe, au palmitate de calcium ou de sodium ou à un mélange de ces deux sels puisque la sous phase utilisée dans ces expériences contenait 100 mM NaCl , 5 mM CaCl_2 et 10 mM Tris à pH 8.9. Ahn et Franses (1992) et Marshbanks et al. (1994) ont mesuré les spectres infrarouge par ATR de films

Langmuir-Blodgett en présence de calcium dans la sous-phase. Ahn et Franses (1992) ont observé un doublet dans la région de 1540-1573 cm^{-1} alors que Marshbank et al (1994). ont obtenu un spectre avec un doublet bien défini à 1538 et 1574 cm^{-1} . Ces observations sont très cohérentes et peuvent être expliquées seulement par la formation d'un complexe de palmitate de calcium. Ces attributions sont aussi confirmées par les spectres de palmitate de calcium solide (Clarke, 1994) qui montrent un doublet à 1540 et 1580 cm^{-1} . Cette étude montre aussi que le spectre du palmitate de sodium possède une bande unique à 1560 cm^{-1} . Globalement, ces résultats suggèrent que la formation du palmitate de calcium est hautement favorisée par rapport au palmitate de sodium pendant l'hydrolyse du DPPC. Ainsi, les deux bandes infrarouges à 1537 et 1575 cm^{-1} observées après l'hydrolyse du DPPC par la PLA2 (figure 38) ont été attribuées au doublet de la vibration $\nu_{\text{a}}\text{COO}^-$ du palmitate de calcium.

L'observation, par Gericke et Hühnerfuss (1994a), de la bande à 1562 cm^{-1} attribuée à la formation du complexe de palmitate de calcium est difficile à expliquer. En effet, la présence d'une telle bande n'a jamais été observée (voir figures 38 à 42) bien que la même sous phase a été utilisée. Il est à noter que la position de cette bande est très près de la bande observée par Clarke (1994) pour le spectre solide du palmitate de sodium. Il est ainsi possible que, dans leurs conditions expérimentales, un complexe de palmitate de sodium soit formé en même temps que le complexe de palmitate de calcium. Cependant, la présence de cette bande peut aussi être due à une mauvaise compensation de l'eau dans leurs spectres.

La présence du doublet à 1537 et 1575 cm^{-1} dans les figures 38, 41 et 42 est attribuée à un effet de champ cristallin comme dans le cas du spectre solide du

palmitate de calcium (Clarke, 1994). Ceci signifie que, dans une monocouche à l'interface air eau, le calcium induit la formation de domaines d'acide palmitique pour former des structures bidimensionnelles organisées possédant une très grande symétrie. Il a d'ailleurs déjà été démontré que le calcium pourrait induire la formation de domaines d'acides gras (Maloney et Grainger, 1993) et de phospholipides (Harvestick et Glaser, 1987). Ce résultat est particulièrement intéressant parce qu'il appuie le mécanisme postulé au chapitre 3 pour la formation de domaines de PLA2 à l'interface air-eau. En effet, il a été proposé par Grainger et al. (1989 et 1990) que l'hydrolyse de monocouches de DPPC entraînait la formation de domaines d'acides gras chargés négativement. La PLA2 s'adsorberait ensuite à ces domaines pour former spontanément des domaines de PLA2. De plus, l'utilisation des lipides asymétriques C6C16-PC et C16C6-PC a permis de démontrer que la présence d'acide gras est essentielle à la formation de domaines de PLA2. En effet, ces domaines de PLA2 peuvent être observés seulement dans le cas où des acides gras restent présents à l'interface après l'hydrolyse, i.e. seulement dans le cas de l'hydrolyse du C6C16-PC. De plus Maloney et Grainger (1993) ont montré que la présence du calcium était essentielle à la formation des domaines d'acides gras et de la formation des domaines de PLA2. Ces auteurs ont aussi montré que la formation de domaines d'acide gras était impossible à pH acide où les acides gras sont protonés et ne portent pas de charge nette. Dans le présent chapitre, nous avons observé des bandes infrarouges (le doublet à 1537 et 1575 cm^{-1}) qui montrent clairement que le calcium est impliqué directement dans la formation des domaines d'acide gras qui représente la première étape de la formation de domaines de PLA2. Ceci constitue donc une preuve directe de l'implication du calcium dans la formation des domaines de PLA2. Cette implication du calcium dans cette première étape de formation des domaines

de PLA2 n'exclut pas que celui-ci pourrait aussi être impliqué dans l'interaction électrostatique entre la PLA2 et les acides gras. Il est en effet aussi possible que la liaison de la PLA2 avec les domaines d'acide gras soit médiée par le calcium associé aux acides gras organisés en domaines à l'interface air-eau.

CHAPITRE 5

MESURE DE L'HYDROLYSE DE MONOCOUCHE DE PHOSPHOLIPIDES PAR LA PLC À L'INTERFACE AIR-EAU

5.1 Introduction

L'hydrolyse de la DPPC par la PLC entraîne la formation de dipalmitoylglycérols (DPG) et de phosphocholines (voir figure 9). Le DPG reste à l'interface alors que la phosphocholine est soluble dans l'eau. Jusqu'à maintenant, deux techniques ont été utilisées pour suivre l'hydrolyse par la PLC de monocouches de phospholipides à l'interface air-eau. Il est, en effet, possible d'obtenir des paramètres cinétiques en mesurant la diminution de radioactivité de surface d'un film de phospholipides marqués avec un phosphate radioactif au niveau de la tête polaire (Piéroni et al., 1990). Avec cette méthode, les auteurs ont mesuré la diminution de la radioactivité de surface due à la solubilisation de la phosphocholine marquée. L'hydrolyse par la PLC entraîne une très faible variation de l'aire moléculaire d'un film de phosphatidylcholine ce qui rend toute mesure de l'hydrolyse de cette façon très difficile. Il est cependant possible d'obtenir indirectement des cinétiques d'hydrolyse de monocouches de phospholipides par la PLC par la mesure de la diminution de l'aire moléculaire en présence d'une autre enzyme (Moreau et al., 1988). Cette enzyme est une lipase qui hydrolyse le diacylglycérol produit par la PLC. Ainsi, en utilisant des phospholipides à chaînes aliphatiques courtes (10-12 carbones), les auteurs ont pu obtenir des cinétiques d'hydrolyse en

mesurant simplement la variation d'aire moléculaire associée à la solubilisation de l'acide gras et du monoacylglycéride. Cependant, aucune de ces deux méthodes ne permet d'obtenir d'information sur l'effet de la PLC sur l'organisation moléculaire des monocouches de phospholipides. De plus, il est fort probable que les cinétiques d'hydrolyse mesurées par radioactivité soient biaisées par la profondeur de détection de cette méthode. En effet, il semble que cette méthode est sensible à toute présence de radioactivité dans les premiers mm à la surface de l'eau (Lamarche, 1988). La mesure sera donc plus limitée par la vitesse de diffusion de la phosphocholine au-delà de la zone de détection que par la vitesse d'hydrolyse par la PLC. Dans ce contexte, il est aussi possible que la phosphocholine contribue à la double couche diffuse associée à la monocouche. Au chapitre 4, nous avons montré que la PM-IRRAS pouvait être utile pour suivre l'hydrolyse de monocouches de phospholipides par la PLA2 et pour obtenir des informations directes sur la réorganisation moléculaire de la monocouche pendant l'hydrolyse. Dans le présent chapitre, nous avons utilisé la spectroscopie PM-IRRAS afin de démontrer qu'il est possible d'étudier l'action d'autres types de phospholipases que la PLA2 par cette technique (Grandbois et al., 1996b).

5.2 Résultats et discussion

5.2.1 Changements dans la bande des C=O ester

Les spectres PM-IRRAS de l'hydrolyse de monocouches de DPPC dans la région de 1800-1100 cm^{-1} avant (spectre a) et après (spectre b) l'hydrolyse par la PLC sont montrés à la figure 44. Les trois bandes les plus intenses du spectre avant

hydrolyse (spectre a) ont été attribuées à l'étirement des $\nu\text{C}=\text{O}$ ester à 1732 cm^{-1} , à la déformation δCH_2 à 1468 cm^{-1} et à l'étirement $\nu_a\text{P}=\text{O}$ à 1228 cm^{-1} . Afin de visualiser plus facilement l'effet de la PLC sur les spectres infrarouges de la DPPC, le spectre de différence (spectre c) entre la monocouche en présence et en absence de PLC (spectres a et b figure 44) a été calculé. Ce spectre montre que d'importants changements spectraux surviennent dans les bandes infrarouges caractéristiques de la DPPC lors de l'hydrolyse de la monocouche. Un des changements des plus importants est le déplacement de la bande des $\text{C}=\text{O}$ ester de 1732 à 1737 cm^{-1} (voir spectres a et b). Comme le montre le spectre de différence (spectre c), ce déplacement est attribuable à l'apparition d'une nouvelle composante à 1739 cm^{-1} .

Blume et al. (1988) ainsi que Lewis et al. (1994) ont montré par déconvolution que la bande des $\text{C}=\text{O}$ ester de la DPPC est constituée d'au moins deux composantes. La première composante est située dans la région de $1740\text{-}1742\text{ cm}^{-1}$ et l'autre dans la région de $1723\text{-}1728\text{ cm}^{-1}$. Par l'utilisation de phospholipides marqués avec un ^{13}C à la position sn-1 ou sn-2 (voir figure. 45) du glycérol, les auteurs ont montré que les deux $\text{C}=\text{O}$ ester du DPPC étaient équivalents et possédaient les mêmes fréquences de vibration. Ainsi, les deux composantes de la bande des $\text{C}=\text{O}$ ester du DPPC ont été attribuées à des sous populations de DPPC possédant des états d'hydratation différents. La composante à $1740\text{-}1742\text{ cm}^{-1}$ est attribuée à une population de DPPC non-hydratée alors que la composante à $1723\text{-}1728\text{ cm}^{-1}$ a été attribuée à une population de DPPC hydraté. Dans nos conditions, l'observation du déplacement de 1732 à 1737 cm^{-1} suggère une augmentation de la proportion de la composante à haute fréquence suite à l'hydrolyse de la monocouche de DPPC

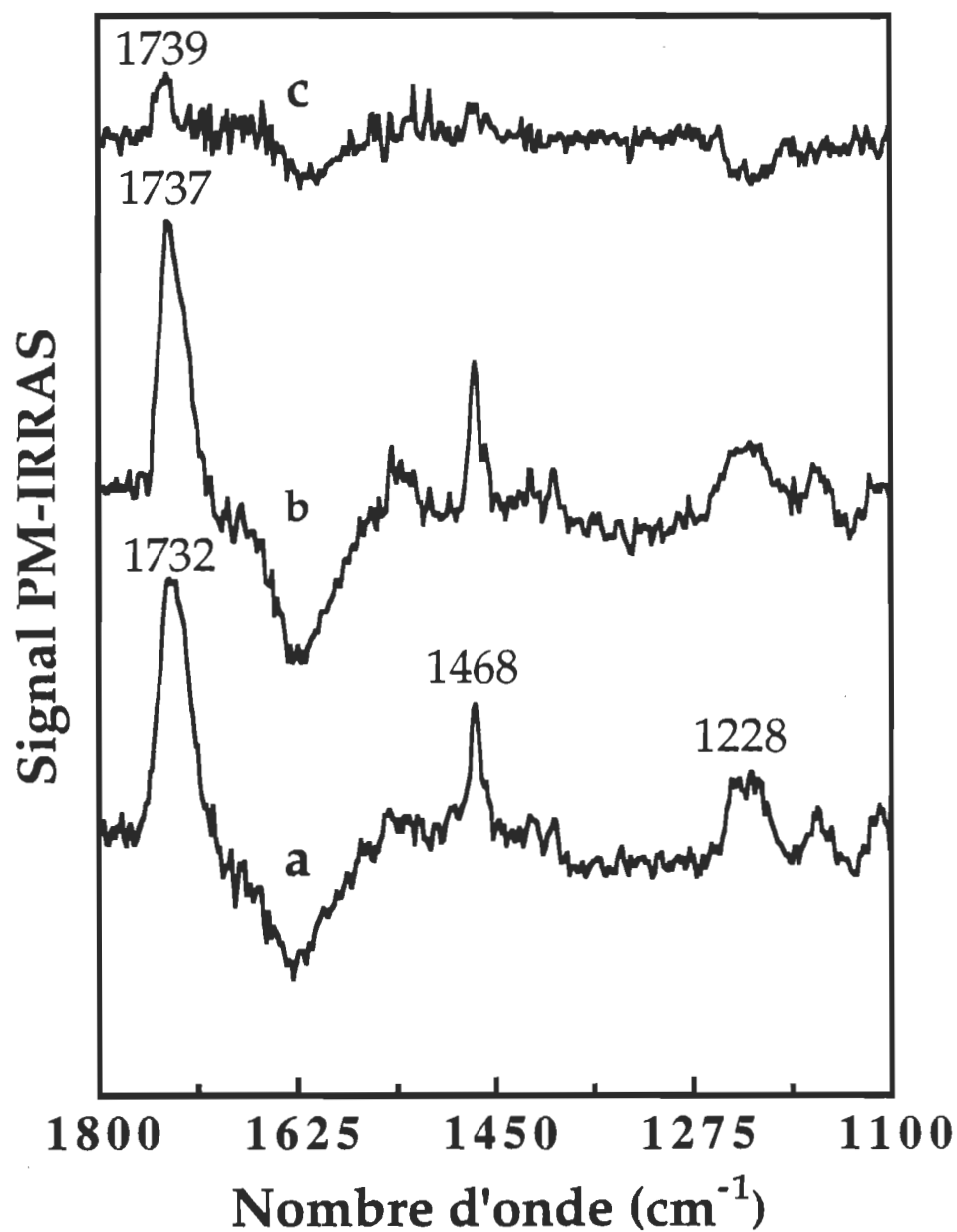


Figure 44 Spectre PM-IRRAS de l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC par la PLC à 7 mN/m. (a) monocouche de DPPC pur avant l'injection de l'enzyme et (b) après 60 min d'hydrolyse par la PLC. (c) Spectre de différence (spectres b - a).

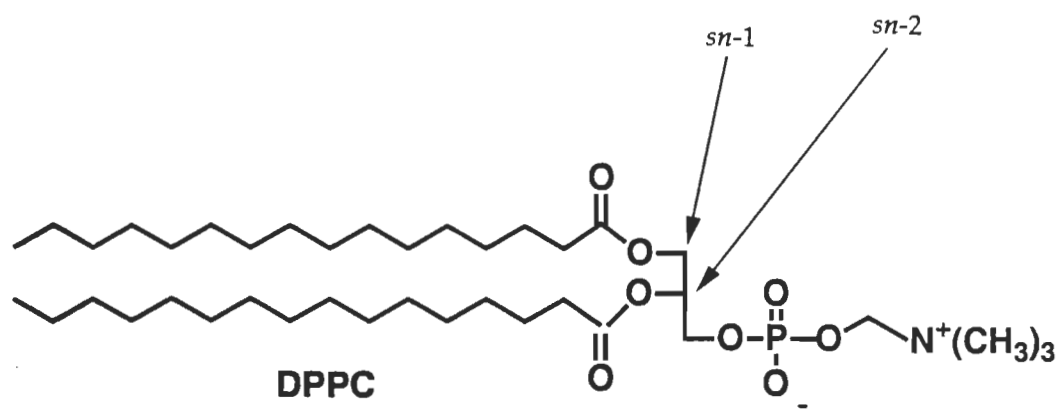


Figure 45 Position des carbones sn-1 et sn-2 du groupement glycérol.

par la PLC. Ce déplacement peut être attribué à la déshydratation des groupements C=O suite à l'hydrolyse.

Un tel comportement peut être comparé à celui observé lors de la transition de phase des phospholipides à cause des changements conformationnels qui y prennent place. En effet, des déplacements similaires de la bande des ν C=O ester ont aussi été observés en monocouche à l'interface air-eau et en vésicules lors de la transition de phase de l'état liquide à solide. En monocouche, un déplacement de 1727 à 1737 cm^{-1} a été observé suite à la compression du DMPC jusqu'à la transition de phase de LE/LC (Cornut et al., 1996). Des résultats très similaires ont été obtenus à partir de vésicules de DPPC (Casal et Mantsch, 1984; Mantsch et al., 1982) pour des spectres mesurés avant et après la transition de phase de l'état liquide cristallin à gel. Il est aussi possible d'observer un déplacement de la bande de C=O ester si on compare les spectres des monocouches de DPPC et de DPG. En effet, les spectres du DPPC et du DPG montrent, respectivement, une bande des C=O ester à 1731 cm^{-1} et 1739 cm^{-1} (figure 46). Rappelons que ces deux bandes sont attribuées à des groupements C=O ester hydratés et déshydratés, respectivement. Ces valeurs correspondent bien aux valeurs de fréquences observées lors de la formation du DPG suite à l'hydrolyse du DPPC par la PLC (voir figure 44). Tous ces résultats suggèrent donc que l'hydrolyse de la monocouche de DPPC par la PLC entraîne une déshydratation des groupements C=O ester présents à l'interface. Ainsi, le DPG produit par l'hydrolyse de la DPPC par la PLC posséderait un moins grand degré d'hydratation que la DPPC à l'interface air-eau.

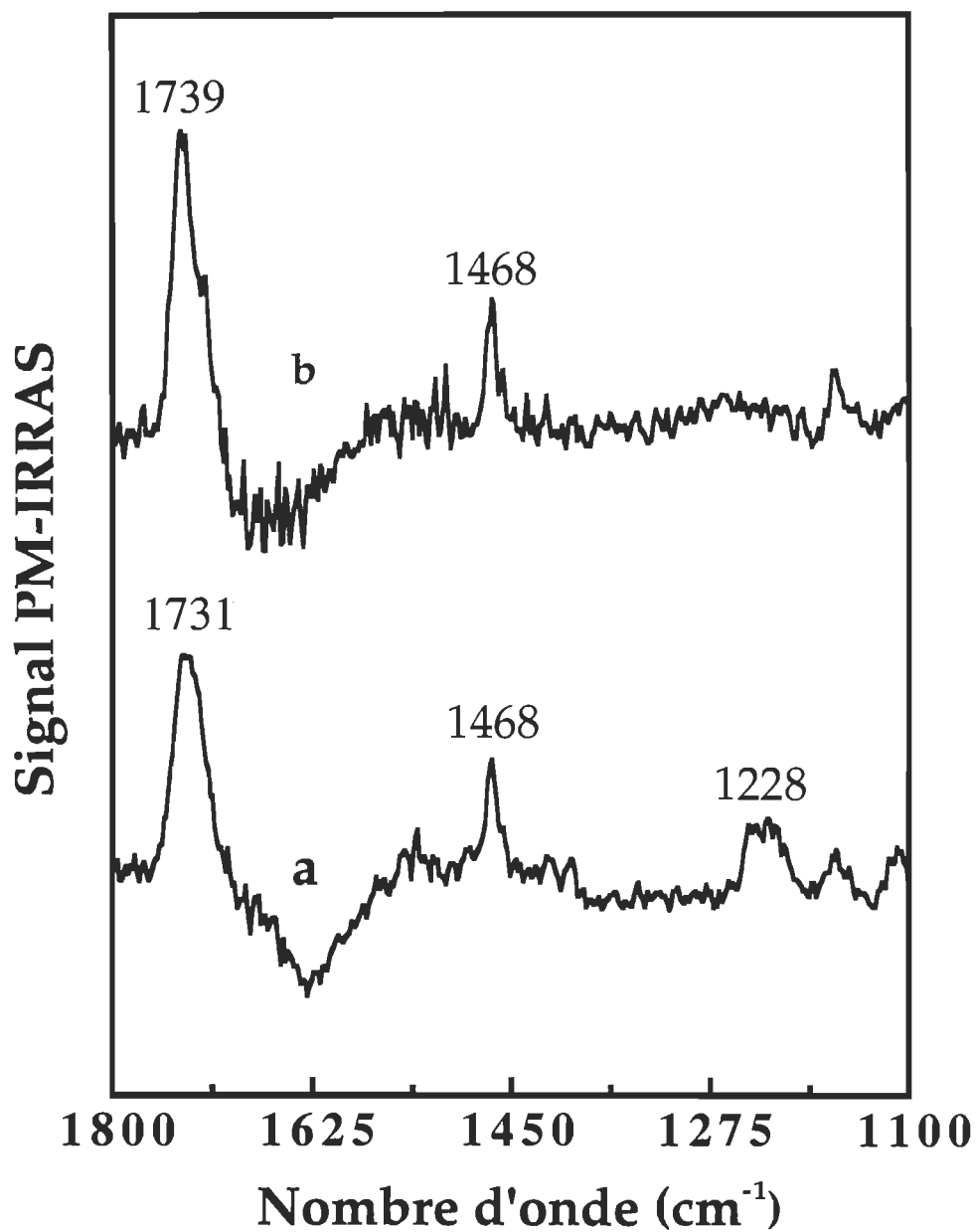


Figure 46 Spectre PM-IRRAS d'une monocouche (a) de DPPC pure et (b) de DPG pur à 7 mN/m.

5.2.2 Changements dans la bande des CH₂

En comparant les spectres avant et après l'hydrolyse du DPPC par la PLC (figure 44), on peut observer une augmentation significative (1,3 fois) de l'intensité de la bande à 1468 cm^{-1} correspondant à la déformation δCH_2 (comparer les spectres a et b). Une telle différence dans l'intensité de cette bande peut aussi être observée en comparant les spectres des composés purs de DPPC et de DPG (figure 46). Ce résultat suggère donc que la formation de DPG suite à l'hydrolyse de la DPPC par la PLC serait responsable de cette augmentation d'intensité de la bande à 1468 cm^{-1} . Cette augmentation d'intensité peut être expliquée par un meilleur entassement des chaînes acyles du DPG comme celui observé pour la transition de phase liquide cristallin à gel du DPPC (Mushayakarara et Levin, 1982). Il est en effet bien connu que des changements conformationnels gauche à tout-trans se produisent pendant cette transition. Mushayakarara et Levin (1982) ont observé une augmentation importante de l'intensité de la bande δCH_2 à 1470 cm^{-1} pour des températures inférieures à la température de transition de phase de la DPPC (42°C). Un comportement similaire a aussi été observé dans le cas de monocouches de DMPC à l'interface air-eau où l'intensité de cette bande était plus grande à forte pression de surface, i.e. au-dessus de la transition de phase LE/LC (Cornut et al., 1996).

5.2.3 Mesure quantitative de l'hydrolyse à l'aide de la bande des phosphates

Le changement le plus spécifique qui peut être directement relié à l'action de la PLC sur une monocouche de phospholipides est la diminution de l'intensité de la bande d'étirement antisymétrique $\nu_{\text{aP=O}}$ à 1228 cm^{-1} . En effet,

cette bande n'apparaît pas dans le spectre du DPG pur à la figure 46 puisque celui-ci ne possède aucun groupement phosphate. Ainsi, la diminution de l'intensité de cette bande au cours de l'hydrolyse par la PLC est due à la solubilisation de la tête polaire phosphocholine dans la sous-phase de la monocouche. Il est à noter que ces mesures sont réalisées à pression de surface constante ce qui élimine l'effet d'un éventuel changement de densité du film lipidique sur l'intensité de la bande des phosphates. Ce changement devrait donc permettre d'obtenir une mesure quantitative de l'hydrolyse de ces monocouches. Sur la figure 44, on peut voir un écart important dans l'intensité de cette bande des phosphates si on compare les spectres a et b. Cet écart est plus facile à visualiser sur le spectre de différence (spectre c) où on voit une bande large et négative à 1228 cm^{-1} . Ainsi, puisque le groupement phosphate fait partie de la tête polaire, il est clair que la diminution de l'intensité de la bande des phosphates est due à la solubilisation du groupement phosphocholine.

L'intégration de l'aire sous la bande des phosphates, avant (spectre a) et après (spectre b) l'hydrolyse de la monocouche par la PLC permet d'estimer la quantité de lipides hydrolysés à un temps donné de l'hydrolyse. Après 1h00 d'hydrolyse, l'aire sous la bande est réduite de 25% ce qui suggère que seulement un quart de la monocouche a été hydrolysé après cette période de temps. La mesure de la variation de l'aire de la bande des phosphates peut donc être considérée comme la façon la plus directe de suivre l'hydrolyse d'une monocouche de phospholipides par la PLC. Il serait donc possible d'obtenir une cinétique d'hydrolyse en mesurant l'aire sous la courbe de la bande phosphate à différents temps d'hydrolyse.

5.2.4 Cinétique d'hydrolyse de la DPPC par la PLC

La mesure de l'hydrolyse par la PLC d'une monocouche du DPPC par la variation du potentiel de surface a aussi été réalisée afin de s'assurer que les changements observés dans les différentes bandes étaient dus à l'action de l'enzyme. La figure 47 montre la variation du potentiel de surface en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DPPC. La diminution du potentiel de 522 mV à 411 mV montre que la monocouche de DPPC subit des changements importants de ses propriétés électriques suite à l'hydrolyse par la PLC. Ces changements peuvent seulement être attribués à l'hydrolyse de la DPPC pour donner le DPG. La mesure du potentiel d'un film pur de DPG donne une valeur du potentiel plus faible que celle de la monocouche de DPPC avant hydrolyse (522 mV). Cependant, la très grande variation de valeur du potentiel mesuré pour le film de DPG pur ne permet pas de faire une comparaison quantitative entre la valeur du potentiel de la monocouche de DPG pur avec celle mesurée à la fin de l'hydrolyse du DPPC. L'incertitude de 100 +/- mV dans le cas du DPG pourrait être due à l'instabilité de ce film qui doit être reliée à sa petite tête polaire.

En résumé, nous avons montré dans ce chapitre que la spectroscopie PM-IRRAS peut fournir des informations importantes sur l'hydrolyse de phospholipides en monocouche par la PLC. En effet, le déplacement de la bande des C=O ester de 1732 à 1739 cm^{-1} donne des informations structurelles directes sur le substrat (DPPC) et le produit d'hydrolyse (DPG) à l'interface air-eau. De plus, des informations sur le degré d'entassement des chaînes acyles sont obtenues à partir de l'observation de l'augmentation de la bande des CH_2 à 1468 cm^{-1} . Finalement, le changement dans l'aire de la bande des phosphates à

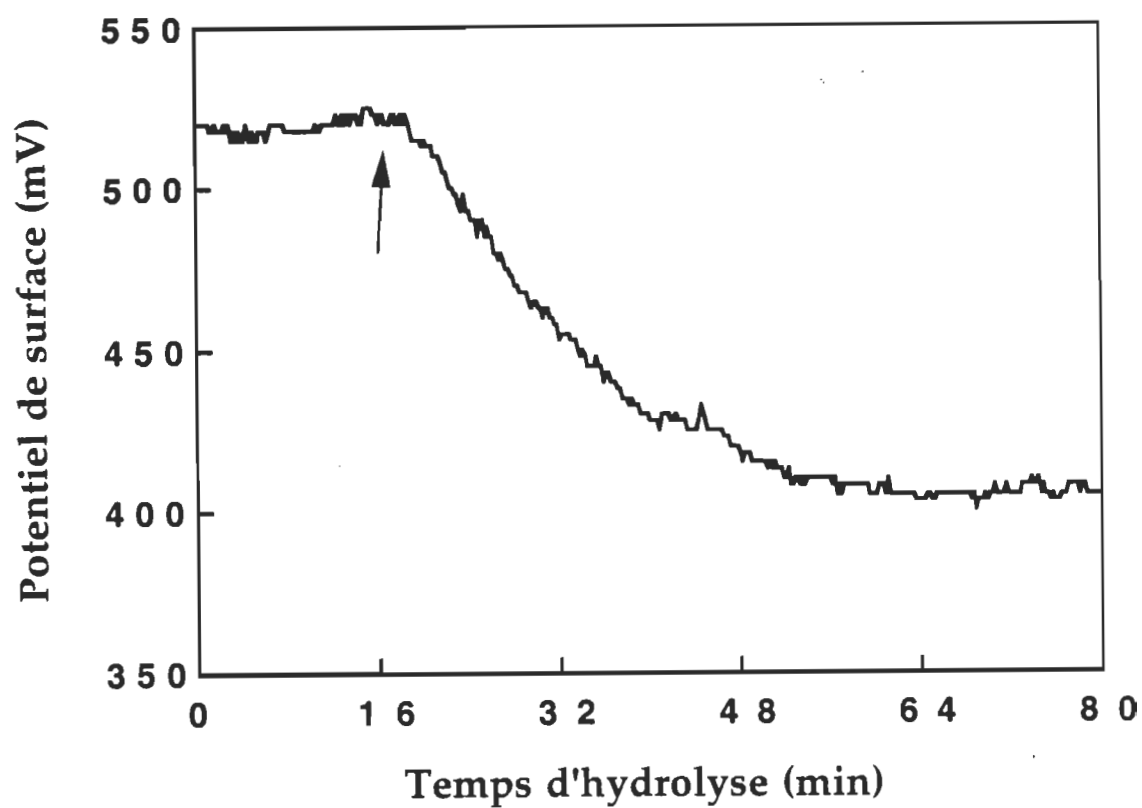


Figure 47 Graphique du potentiel de surface à pression constante (7mN/m) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DPPC par la PLC. La flèche marque l'injection de l'enzyme.

1228 cm^{-1} qui est dû à l'hydrolyse et à la solubilisation du groupement phosphocholine de la DPPC est une autre caractéristique qui permet de suivre, de façon quantitative, l'activité de l'enzyme à l'interface.

CHAPITRE 6

ÉTUDE DU SYNERGISME ENTRE LA PLA2 ET LA MÉLITTINE.

6.1 Introduction

La mélittine (MEL) et la PLA2 sont les deux constituantes majeures de nombreux venins et sont connues pour leur effet synergique dans leur action sur les membranes (Mollay et Kreil, 1974). Il a été proposé, en utilisant des surfactants chargés positivement, que la présence des 5 charges positives de la mélittine à la surface de la membrane augmenterait l'affinité de la PLA2 pour la membrane et stimulerait ainsi son activité enzymatique (Conricode et Ochs, 1989). Dans ce chapitre, différents peptides analogues de la mélittine ont été utilisés afin de clarifier, de façon directe, l'importance des charges positives de la mélittine dans l'activation de la PLA2. Le tableau 2 montre la structure des peptides LK12 et LK22 comportant différents nombres de charges positives. Comme la séquence le montre, ces peptides sont constitués uniquement de résidus leucine hydrophobes et lysine hydrophiles disposés de façon à générer une hélice alpha amphiphile idéale (voir figure 48, Cornut et al. 1994). Ces peptides sont hautement hémolytiques et leur activité dépend de leur longueur. Le peptide LK22 possède 7 charges positives et une activité hémolytique environ 8 fois supérieure à celle de la mélittine alors que le LK12 possède 4 charges positives et son activité est d'environ 10 fois inférieure à celle de la mélittine (Cornut et al., 1994).

Peptide	Séquence
MEL	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂
LK22	KLLKLLLKLLLKLLKLLLKLLK-NH ₂
LK12	KLLKLLLKLLLK-NH ₂

L:Leucine-CH₂CH(CH₃)₂
K:Lysine-(CH₂)₄NH₃⁺

Tableau 2 Structure de la mélittine (MEL) et de ses analogues.

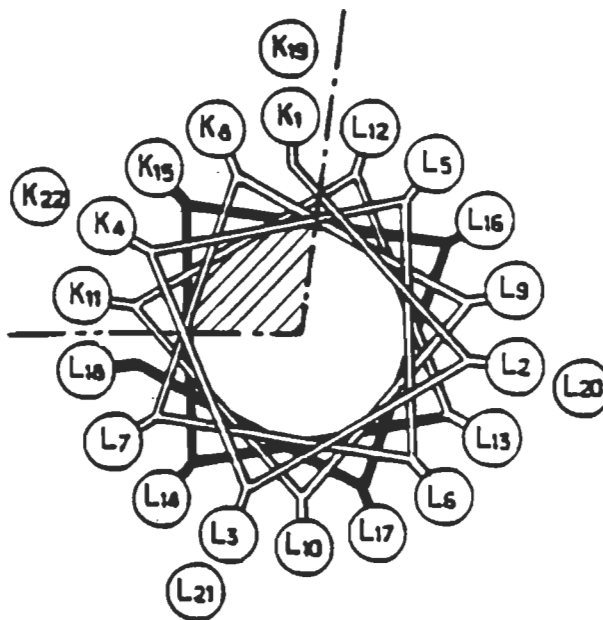


Figure 48 Projection des peptides analogues montrant le caractère amphiphile des hélices-alpha.

La vitesse d'hydrolyse de monocouches de différents phospholipides (DDPC et DPPC) en présence et en absence de peptides analogues ou de mélittine a été déterminée en mesurant la variation de l'aire moléculaire et du potentiel de surface (Grandbois et al., 1996c). De plus, il a été proposé que la stimulation de l'activité de la PLA2 par la mélittine pourrait être reliée à la création de défauts dans l'organisation lipidique de la membrane (Burack et Biltonen, 1994). Vernon et Bell, (1992) ont proposé que la présence d'agents amphiphiles comme la mélittine ou la cardiotoxine créait des défauts dans le feuillet bilipidique de façon à permettre une plus grande accessibilité de la PLA2. Burack et Biltonen (1994) ont quant à eux montré que différentes propriétés de la structure membranaire (état physique, transition de phase et présence d'impureté) pouvaient jouer un rôle très important dans la régulation de l'activité de la PLA2. Cette hypothèse a été vérifiée en visualisant, par microscopie à épifluorescence, l'hydrolyse de domaines solides de DPPC dans la transition de phase LE/LC par la PLA2 en présence et en absence de mélittine et de ses analogues.

6.2 Résultats et discussion

6.2.1 Hydrolyse de monocouches de DDPC en présence et en absence de peptides

Contrairement à l'isotherme du DPPC qui présente une transition LE/LC à 7-8 mN/m, l'isotherme du DDPC (Demel et al., 1967; Joos et Demel, 1969 et Phillips et al., 1975) montre uniquement un isotherme liquide-expansé. Les cinétiques d'hydrolyse du DDPC sont donc mesurées dans la phase liquide de l'isotherme (15 mN/m). La figure 49 présente la cinétique d'hydrolyse du DDPC en présence

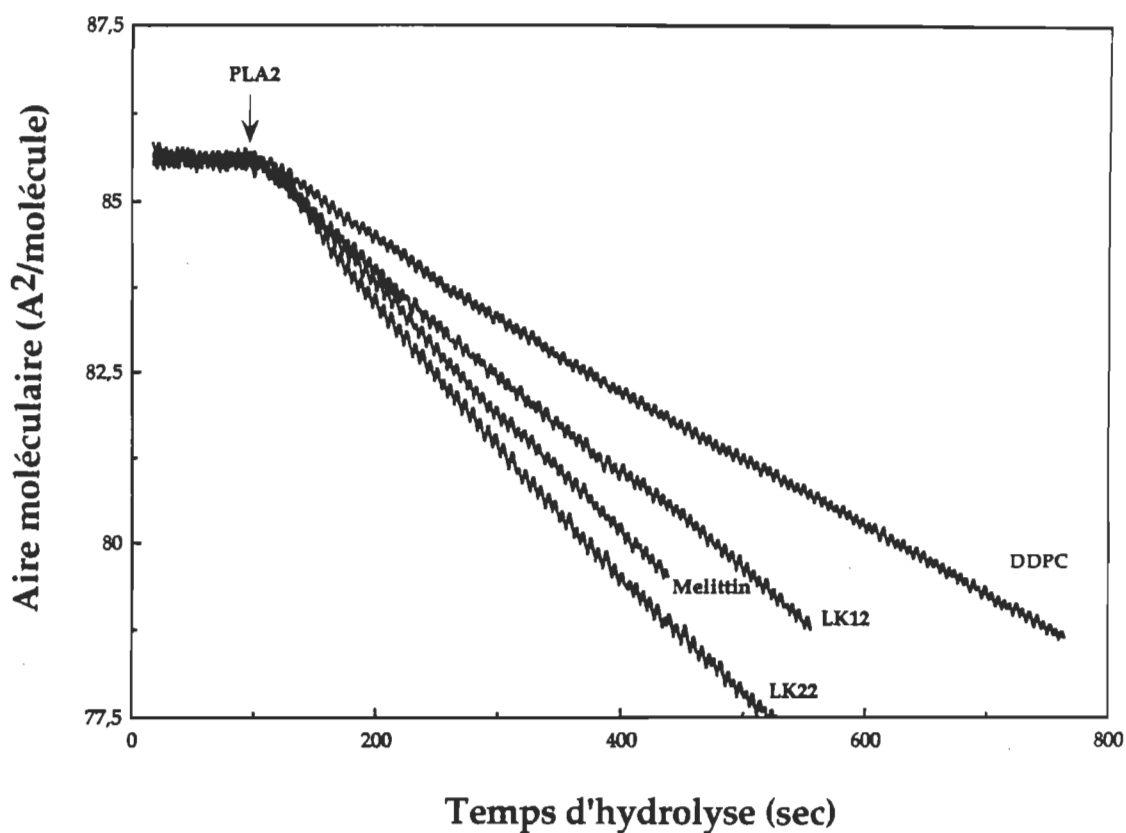


Figure 49 Graphique de l'aire moléculaire à pression de surface constante (15 mN/m) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DDPc. Les peptides (2 mol%) ont été ajoutés directement à la solution de DDPc.

et en absence de la mélittine ou de ses analogues (LK12 et LK22). L'hydrolyse de ce phospholipide portant deux chaînes aliphatiques de 10 carbones donne deux produits d'hydrolyse (acide décanoïque et C10Lyso-PC) qui sont solubles dans la sous-phase. La diminution observée dans l'aire moléculaire est donc directement reliée à la solubilisation des produits d'hydrolyse dans la sous-phase de la monocouche. Le potentiel de surface ne varie pas au cours de ces mesures puisque la composition lipidique, donc le potentiel de surface, ne change par de façon significative. En effet, puisque les produits d'hydrolyse sont solubles dans la sous-phase, la monocouche reste toujours composée de DDPC ou de DPPC-peptide suite à son hydrolyse par la PLA2. Les vitesses d'hydrolyse présentées au tableau 3 ont été calculées à partir de la pente initiale des cinétiques d'hydrolyse de la figure 49. Les résultats de ce tableau montrent que la vitesse d'hydrolyse est plus élevée dans le cas de monocouche en présence de mélittine ou de peptide. Ce résultat est en accord avec les expériences de Mollay et Kreil (1974) qui montrent une augmentation de la vitesse d'hydrolyse de vésicules de phospholipides par la PLA2 en présence de mélittine. Ce résultat montre donc, dans un premier temps, que la technique des monocouches est adéquate pour étudier l'effet synergique entre la mélittine et la PLA2. Cependant, l'effet observé dans le présent travail est beaucoup moins important que celui observé par Mollay et Kreil (1974). Cette différence peut s'expliquer par leur concentration de PLA2 qui était quatre fois plus élevée que la nôtre. La figure 49 montre aussi que la vitesse d'hydrolyse augmente avec le nombre de charges positives des peptides à l'interface. En effet, la vitesse d'hydrolyse en présence de LK22 (7 charges positives) est plus élevée que dans le cas du LK12 (4 charges positives), alors que la mélittine (5 charges positives) se situe entre ces deux analogues. Dans leurs interactions avec les phospholipides, ces peptides sont connus pour avoir une orientation parallèle

	Vitesse d'hydrolyse ($10^{-2} \text{Å}^2 \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	$\frac{\text{DDPC+PEPTIDE}}{\text{DDPC}}$
DDPC	1.2	----
DDPC+LK12	1.8	1.5
DDPC+MEL	2.0	1.7
DDPC+LK22	2.4	2.1

Tableau 3 Vitesses d'hydrolyse des monocouches de DDPC et DDPC-peptides calculées à partir de la pente initiale des cinétiques de la figure 49. La dernière colonne correspond au rapport entre les vitesses en présence et en absence de peptide.

	Vitesse d'hydrolyse (mV sec^{-1})	$\frac{\text{DPPC+PEPTIDE}}{\text{DPPC}}$
DPPC	0.55	----
DPPC+MEL	0.67	1.2
DPPC+LK12	0.73	1.3
DPPC+LK22	1.28	2.3

Tableau 4 Vitesses d'hydrolyse des monocouches de DPPC et DPPC-peptides calculées à partir de la pente initiale des cinétiques de la figure 50.

au plan de la membrane (Cornut et al., 1996). Dans cette orientation, les charges positives des résidus lysine sont exposées à la sous-phase. Ainsi, puisque que le LK12 et le LK22 sont structurellement très semblables, il est possible de corrélérer l'augmentation de la vitesse d'hydrolyse de la monocouche avec l'augmentation du nombre de charges positives des peptides de +4 à +7. De plus, comme la vitesse d'hydrolyse en présence du peptide le plus court (LK12) n'est pas très différente de celle en présence de mélistine ($1.8 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ et $2.0 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, respectivement), la longueur des peptides peut difficilement être utilisée comme un critère pour expliquer la synergie entre la PLA2 et la mélistine.

6.2.2 Hydrolyse de monocouches de DPPC en présence et en absence de peptides

Les cinétiques d'hydrolyse de monocouche de DPPC en présence et en absence de peptides sont présentées à la figure 50. Dans ce cas, les produits d'hydrolyse (acide palmitique et C16Lyso-PC) ne sont pas solubles dans la sous-phase. Ainsi, au contraire de la DDPC, il est impossible de déterminer la vitesse d'hydrolyse par la mesure de la diminution de l'aire moléculaire de la monocouche de DPPC. Cependant, le potentiel de surface d'une monocouche de DPPC non-hydrolysée est très différent de celui d'une monocouche de DPPC hydrolysée contenant les deux produits d'hydrolyse. La variation du potentiel de surface en fonction du temps d'hydrolyse a donc été utilisée pour mesurer l'action de la PLA2 sur une monocouche de DPPC en présence et en absence de peptides. La figure 51 montre que la vitesse d'hydrolyse pour les différentes monocouches augmente de la façon suivante; DPPC pure \ll MEL-DPPC \leq LK12-DPPC \ll LK22-DPPC (voir aussi tableau 4). À partir de ces résultats, il apparaît donc que ces peptides ont un effet très similaire pour les deux

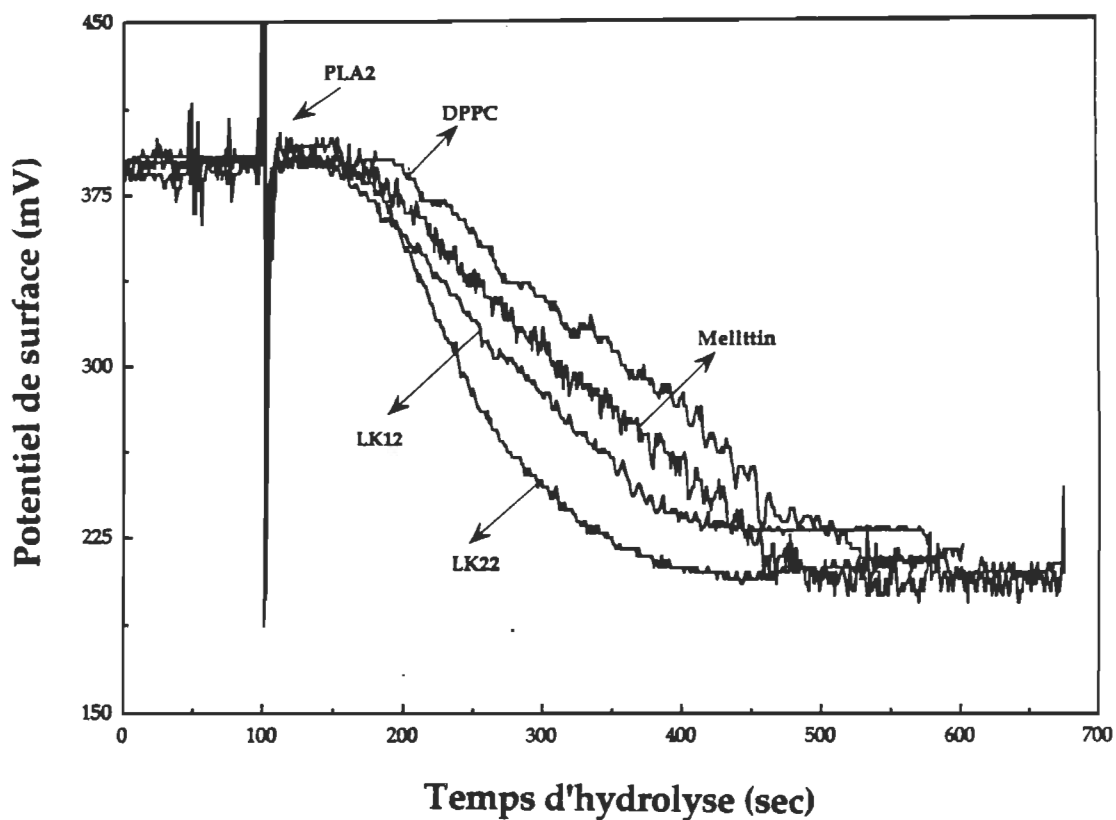


Figure 50 Graphique du potentiel de surface à pression de surface constante (7 mN/m) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DPPC. Les peptides (10^{-6} M) ont été injectés dans la sous-phase de la monocouche.

phospholipides utilisés (DDPC et DPPC). En effet, la séquence des vitesses d'hydrolyse de ces deux phospholipides en présence des différents peptides est semblable sauf pour la mélittine qui montre une vitesse d'hydrolyse un peu plus élevée que le LK12 dans le cas du DPPC alors que le contraire est observé dans le cas du DDPC (voir tableaux 3 et 4).

Les résultats obtenus avec le DDPC et le DPPC suggèrent que l'augmentation de la quantité de charges positives portées par le peptide augmente l'affinité de la PLA2 pour la monocouche et, par conséquent, augmente la vitesse d'hydrolyse des phospholipides par la PLA2. Ceci pourrait être dû à une interaction spécifique entre les charges positives du peptide et des charges négatives présentes à la surface de l'enzyme. Cette suggestion est en accord avec les résultats de Conricode et Ochs (1989) qui montrent une augmentation de l'activité de la PLA2 en présence de surfactants cationiques. Les résultats présentés plus haut, obtenus avec la mélittine et les peptides analogues (LK12 et LK22), permettent une confirmation directe de l'importance des charges positives de la mélittine dans son synergisme avec la PLA2.

6.2.3 Note sur les concentrations de peptides utilisées

Dans les expériences avec la DDPC, les peptides furent ajoutés directement à la solution de phospholipide. Une concentration de 2 mol% de peptide par rapport au lipide a été suffisante pour permettre l'augmentation de l'activité de l'enzyme. Cependant, dans le cas de la DPPC, il a été impossible d'obtenir un effet des peptides sur l'activité de la PLA2 même lorsque 4 mol% de peptide était ajouté à la solution de phospholipide. Ainsi, pour ces expériences, les peptides ont été injectés dans la sous-phase pour donner une concentration de

10^{-6} M. Il est probable que cette différence de comportement des peptides en présence des deux phospholipides soit due à l'interaction des produits d'hydrolyse avec le peptide dans le cas de la DPPC. En effet, dans ce cas, les acides gras produits demeurent à l'interface et leurs charges négatives (groupement carboxylique) est très susceptible d'interagir avec les charges positives des peptides. Une plus grande concentration de peptides serait donc nécessaire car il est possible que l'effet de la charge des peptides soit partiellement neutralisé par les acide gras. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Monette et Lafleur (1995) qui montrent une interaction favorable entre la mélittine et des acides gras déprotonés dans une bicouche lipidique. Les spectres PM-IRRAS d'un mélange DPPC:acide palmitique (1:1) en présence et en absence de LK22 dans la sous-phase ont été mesurés afin de montrer l'interaction entre les peptides et les acides gras (figure 51). Le spectre avant injection de peptides (spectre a) montre les bandes caractéristiques décrites au chapitre 4: les $\nu_{\text{C=O}}$ ester à 1733 cm^{-1} , la déformation δ_{CH_2} à 1468 cm^{-1} et le doublet ν_{aCOO^-} du palmitate de calcium à 1537 et 1575 cm^{-1} . Les positions de ces bandes sont tout à fait similaires à celles observées au chapitre 4. Le spectre b a été obtenu 60 min après l'injection du LK22 dans la sous-phase. Sur ce spectre, on note une diminution très importante de l'intensité des bandes du C=O ester et du doublet du palmitate de calcium. Cependant, la fréquence de ces bandes est tout à fait identique à celles observées dans le cas du film sans peptide (spectre a). Ce spectre montre aussi une nouvelle bande à 1657 cm^{-1} attribuée à la bande amide I du peptide LK22. Cette attribution est en accord avec les résultats de Cornut et al. (1996) qui montrent que le spectre du LK22 pur à l'interface air-eau est composé d'une bande amide I intense à 1657 cm^{-1} et d'une bande amide II très faible à 1536 cm^{-1} . Ainsi, puisque la fréquence du doublet du palmitate de calcium et celle de la bande amide I du LK22 restent

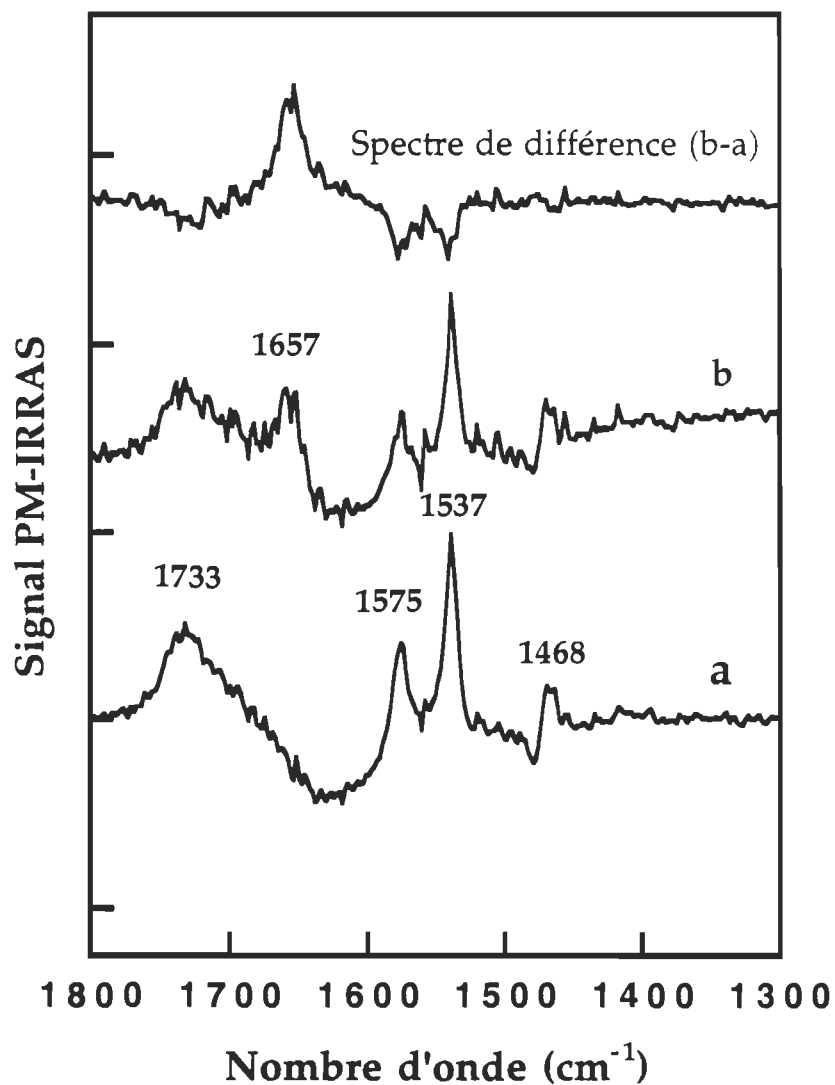


Figure 51 Spectre PM-IRRAS d'une monocouche composée d'un mélange de DPPC:acide palmitique (1:1) en absence (a) et en présence (b) de LK22. Le LK22 a été injecté dans la sous-phase de la monocouche.

inchangées lorsque ceux-ci sont mis en présence, il est très peu probable qu'il y ait une interaction directe entre l'acide gras et le peptide dans ces conditions expérimentales. La diminution de l'intensité des bandes du C=O ester et du doublet du palmitate de calcium est très probablement causée par une simple dilution de ces composantes à l'interface par la présence du peptide. Il semble donc impossible pour le LK22 chargé positivement de déplacer les contre-ions calcium des acides gras dans nos conditions expérimentales. Il aurait peut-être été possible d'observer une interaction entre le LK22 et l'acide palmitique déprotoné en absence de calcium. Ainsi, l'hypothèse de l'interaction entre le LK22 et les acides gras ne permet pas d'expliquer qu'il soit nécessaire d'injecter le peptide directement dans la sous-phase dans les expériences avec la DPPC pour observer une activation de la PLA2.

6.2.4 Visualisation de monocouches de DPPC dans la transition de phase à l'aide d'un peptide marqué

Les peptides analogues marqués avec un dansyle (LK22-DNS et LK12-DNS) ont été utilisés afin d'observer directement leur distribution préférentielle dans les phases liquide et solide de la monocouche de DPPC. La figure 52 montre une micrographie d'épifluorescence en présence de LK22-DNS. Sur cette micrographie, on peut observer les domaines de DPPC dans l'état solide-condensé dans une matrice fluorescente contenant le LK22-DNS qui correspond à la phase liquide de la DPPC. Le mauvais contraste obtenu dans ces expériences est dû au très faible rendement quantique du dansyl qui a été utilisé pour marquer les peptides et à la faible concentration de ce peptide dans la monocouche. Le même résultat a été obtenu pour les deux peptides. Ces

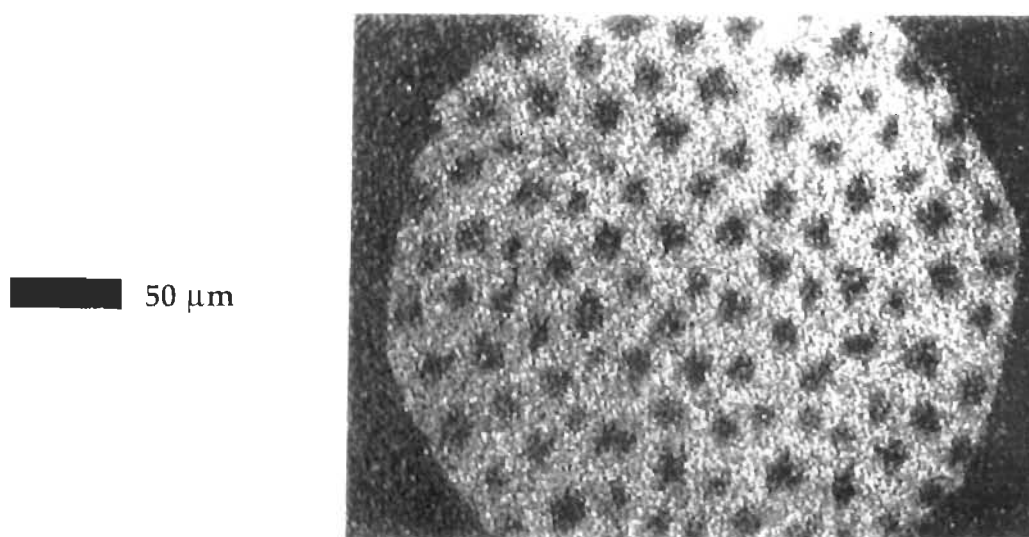


Figure 50 Graphique du potentiel de surface à pression de surface constante (7 mN/m) en fonction du temps d'hydrolyse d'une monocouche de DPPC. Les peptides (10^{-6}M) ont été injectés dans la sous-phase de la monocouche.

résultats suggèrent que les peptides se lient de façon préférentielle à la phase liquide des phospholipides. Ceci est en accord avec les résultats de Mollay et Kreil (1974) qui montrent que la mélittine n'active pas l'hydrolyse de vésicules de DPPC à une température inférieure à la température de transition liquide-gel du DPPC (42°C). Ainsi, une bicouche lipidique dans l'état gel ne permettrait pas la liaison de la mélittine.

6.2.5 Visualisation de l'hydrolyse de monocouches de DPPC dans la transition de phase en présence et en absence de peptides.

Ces expériences ont été réalisées avec une monocouche de DPPC dans la transition de phase. Dans ce cas, la monocouche a été visualisée à l'aide de la fluorescence de la PLA2 marquée avec la sulforhodamine. Ce fluorophore possède un rendement quantique beaucoup plus élevé que le dansyle, ce qui permet d'obtenir des micrographies de la monocouche avec un meilleur contraste. La figure 53a montre les domaines de DPPC pure après 5 min d'hydrolyse. Il est possible de voir sur cette micrographie que l'hydrolyse des domaines de DPPC dans l'état solide-condensé par la PLA2 se produit seulement à un endroit à la frontière de la phase solide-liquide (Grainger et al., 1989). La situation en présence de peptides (LK22 ou LK12) est visuellement très différente. En effet, quand les peptides sont présents (figure 53b), l'hydrolyse se produit tout autour, à plusieurs points, des domaines de DPPC. Dans ce cas, l'hydrolyse de ces domaines est très rapide. En effet, après 10 minutes seulement (figure 53c), il devient très difficile de distinguer la forme initiale des domaines de DPPC alors que pour une monocouche de DPPC pure, il n'existe pratiquement aucune différence entre 5 et 10 min d'hydrolyse. Des

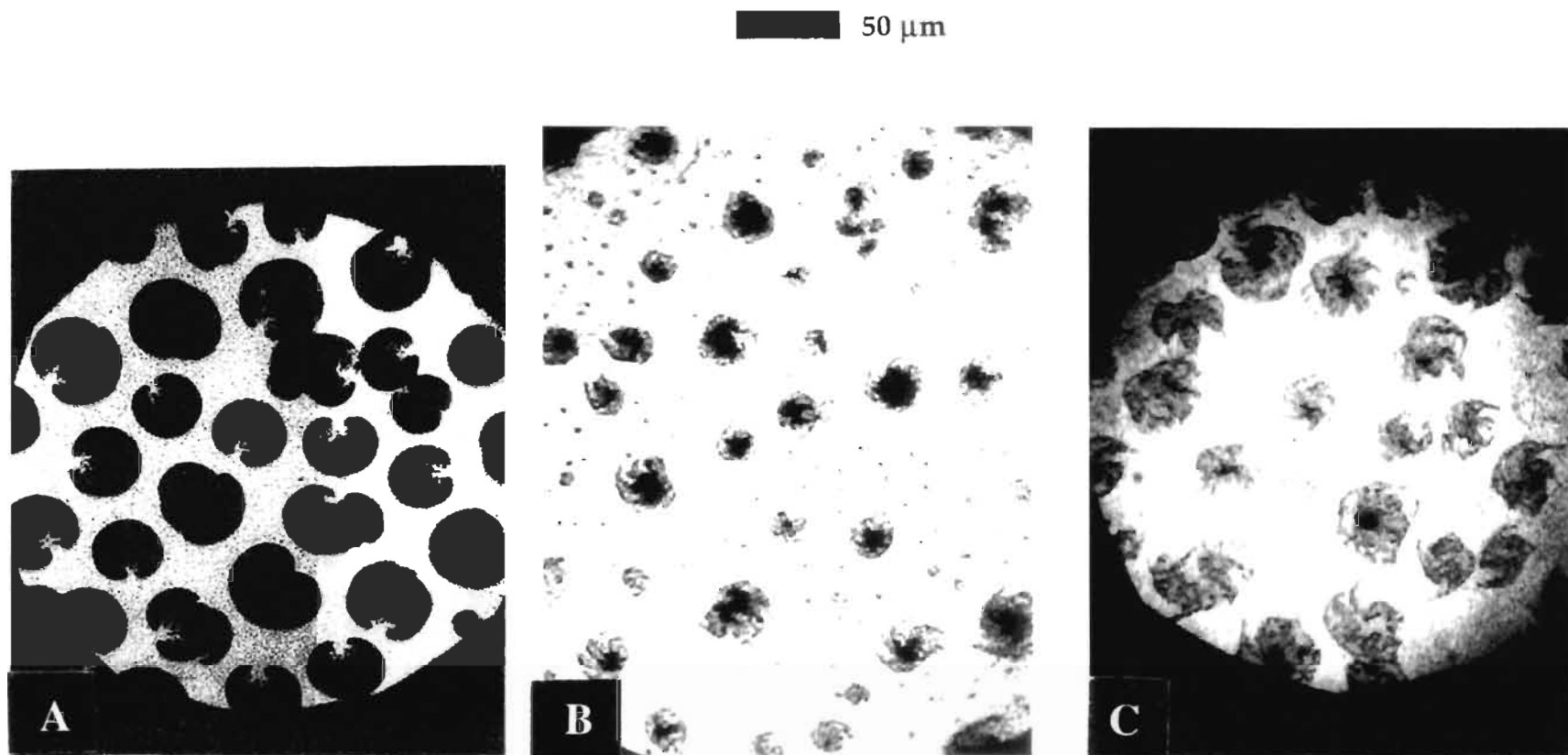


Figure 53 Micrographie à épifluorescence montrant l'hydrolyse par la PLA2 d'une monocouche de DPPC dans la transition de phase de liquide-étendu à solide-condensé (7 mN/m). (a) Monocouche de DPPC pur, (b) monocouche de DPPC en présence de LK22 après 1 min d'hydrolyse, (c) après 10 min. Les monocouches sont visualisées à partir de la fluorescence de la PLA2 marquée avec de la rhodamine.

micrographies tout à fait similaires à celles de la figure 53 ont été obtenues avec la mélittine et le LK12. Ces résultats suggèrent fortement que l'activation de la PLA2 par ces peptides n'est pas seulement due à la présence de charges positives mais aussi à leur habileté à créer des défauts dans l'organisation des monocouches des phospholipides. Cette évidence optique est appuyée par des données cinétiques (Romero et al., 1987) qui montrent que la présence de défauts dans la transition de phase LE/LC augmente la vitesse d'hydrolyse des phospholipides par la PLA2.

CHAPITRE 7

CONCLUSION

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont permis de répondre principalement à trois questions concernant l'action de phospholipases sur un substrat lipidique organisé:

La première de ces questions concernait la composition et l'organisation des domaines de PLA2 observés par Grainger et al. (1989, 1990) lors de l'hydrolyse de monocouches de DPPC à l'interface air-eau. Afin de déterminer la composition lipidique permettant la liaison de la PLA2 et la formation subséquente de domaines de cette enzyme, les phospholipides asymétriques C6C16-PC et C16C6-PC ont été utilisés. L'hydrolyse de ces phospholipides par la PLA2 produisait une monocouche contenant, respectivement, de l'acide palmitique ou du C16Lyso-PC. Ainsi, la présence d'un seul de ces deux produits d'hydrolyse devait nous permettre de déterminer leur importance respective dans la formation de ces domaines de PLA2. Les mesures de la variation de l'aire moléculaire et du potentiel ont permis de confirmer que, suite à leur hydrolyse par la PLA2, les monocouches de C16C6-PC et C6C16-PC étaient composées, respectivement, de C16Lyso-PC et d'acide palmitique. Ces résultats ont été aussi confirmés par spectroscopie PM-IRRAS. Les observations subséquentes par épifluorescence ont permis de montrer que la présence d'acides gras était essentielle alors que celle de la Lyso-PC n'était pas nécessaire à la formation des domaines de PLA2. Cependant, la forme amorphe des domaines observés au cours de l'hydrolyse de la C6C16-PC, comparativement à

la forme chirale observée par Grainger et al. (1989), nous a amené à suggérer que la présence de Lyso-PC ou DPPC pourrait être responsable de cette morphologie chirale. L'analyse approfondie des spectres PM-IRRAS de la DPPC et de la C6C16-PC a aussi permis de montrer que les acides gras formaient des domaines à l'interface air-eau impliquant le calcium. En effet, le doublet à 1537 et 1575 cm^{-1} apparaissant après l'hydrolyse du DPPC et du C6C16-PC a été attribué à la présence de domaines cristallins d'acides gras sous forme de sels de calcium. Ces observations confirment l'hypothèse de Maloney et Grainger (1993) qui suggère que les acides gras forment spontanément des domaines auxquels se liait la PLA2. La spectroscopie PM-IRRAS des domaines de PLA2 a aussi été utilisée pour étudier l'organisation de cette dernière. La différence entre les rapports des bandes amides I et II des spectres PM-IRRAS et en poudre de la PLA2 a été utilisée pour estimer l'organisation de la PLA2 dans les domaines. La comparaison entre les rapports des bandes amide I et II de la PLA2 dans les domaines à l'interface air-eau et sous forme de poudre suggère que celle-ci ne subit aucun changement conformationnel suite à son adsorption aux domaines d'acides gras. Ces résultats suggèrent aussi que la PLA2 n'adopte aucune organisation préférentielle dans les domaines à l'interface air-eau.

La seconde question à laquelle répond ce travail concerne l'applicabilité des mesures d'aire moléculaire, de potentiel de surface et de PM-IRRAS dans l'étude de l'action d'autres enzymes lipolytiques comme la PLC sur des monocouches de phospholipides à l'interface air-eau. Ainsi, il a été démontré que la spectroscopie PM-IRRAS pouvait aussi être utilisée pour suivre l'hydrolyse de monocouches de phospholipides par la PLC. En effet, il est possible de suivre l'hydrolyse d'une monocouche de DPPC par la PLC en analysant les variations dans les bandes infrarouges caractéristiques des

phospholipides. Les spectres PM-IRRAS de l'hydrolyse de la DPPC ont permis de montrer que d'importants changements structurels prenaient place suite à la formation du produit d'hydrolyse, le dipalmitoylglycérol. Ces changements ont été mis en évidence par le déplacement vers les hautes fréquences de la bande de C=O ester ainsi que par l'augmentation d'intensité de la bande des CH₂. De plus, la diminution de l'aire sous la courbe de la bande des phosphates a permis de suivre quantitativement l'hydrolyse de monocouches de DPPC par la PLC. Enfin, la mesure de la variation du potentiel de surface suite à l'hydrolyse de la DPPC par la PLC a été utilisée afin de confirmer les résultats obtenus en PM-IRRAS.

Le dernier objet de cette thèse concernait l'étude du synergisme entre la méliittine et la PLA2. Deux peptides analogues de la méliittine portant différentes charges (LK12 et LK22) ont été utilisés afin de démontrer l'importance des charges positives de la méliittine dans l'activation de la PLA2 au cours de l'hydrolyse des phospholipides. Les mesures de la variation de l'aire moléculaire lors de l'hydrolyse du DDPC en présence et en absence de méliittine ou de peptides analogues suggèrent que la présence de charges sur le peptide est responsable de l'augmentation de l'activité de la PLA2. Ces résultats ont été confirmés par des mesures de variation du potentiel de surface suite à l'hydrolyse de monocouches de DPPC en présence ou en absence de méliittine ou de ses analogues. Dans l'ensemble, ces résultats ont démontré l'importance des charges positives de la méliittine dans l'activation de la PLA2. Les mesures par épifluorescence de l'hydrolyse par la PLA2 de monocouches de DPPC dans la transition de phase LE/LC, montrent que les domaines de solides DPPC sont hydrolysés à partir d'un seul point à la bordure de ces domaines (Grainger et al., 1989). Cependant, l'hydrolyse de monocouches en présence de peptides se

produit à plusieurs endroits à la fois, tout autour de ces domaines de DPPC dans l'état solide. Ces résultats suggèrent fortement que l'effet des peptides sur la PLA2 pourrait aussi être dû à la création de défauts dans l'organisation des monocouches de phospholipides. Ainsi, l'activation de la PLA2 en présence de mélittine pourrait être due, d'une part, aux charges positives portées par la mélittine et, d'autre part, à la création de défauts dans l'organisation des phospholipides membranaires.

RÉFÉRENCES

Ahn, D.J. et Franses E.I. Orientations of chain axes and transition moments in Langmuir-Blodgett monolayers determined by polarized FTIR-ATR spectroscopy. J. Phys. Chem., 1992, 96, 9952-9959.

Benachir, T. et Lafleur, M. Study of vesicle leakage induced by melittin. Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1235, 452-460.

Berridge, M. J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. Ann. Rev. Biochem., 1987, 56, 159-193.

Blaudez, D. Spectroscopie différentielle infrarouge par modulation de polarisation de films monomoléculaires déposés sur substrats solides et à l'interface air/eau. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux. 1993.

Blaudez, D., Buffeteau, T., Cornut, J. C., Desbat, B., Escafre, N., Pézolet, M. et Turlet, J. M. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. Appl. Spectroscopy, 1993, 45, 869-873.

Blaudez, D., Buffeteau, T., Cornut, J.C., Desbat, B., Escafre, N., Pézolet, M. et Turlet J.M. Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air-water interface. Thin Solid Films, 1994, 242, 146-150.

Blume, A. Apparent molar heat capacities of phospholipids in aqueous dispersion. Effect of chain length and head group structure. Biochemistry, 1983, 22, 5436-5442.

Blume, A., Hubner, W. et Messner, G. Fourier transform infrared spectroscopy of ^{13}C C=O labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. Biochemistry, 1988, 27, 8239-8249.

Bradick, T.D., Dasseux, J.-L., Abdalla, M., Aminzadeh, A. et Georghiou, S. Effet of bee venom melittin on the order and dynamics of dimyristoyl-phosphatidylcholine unilamellar and multilamellar vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 900, 17-26.

Brockman, H. Dipole potential of lipid membranes. Chem. Phys. Lipids, 1994, 73, 57-79.

Buffeteau, T., Desbat, B. et Turlet, J. M. Polarization modulation FT-IR spectroscopy of surfaces and ultra-thin films: experimental procedure and quantitative analysis. Appl. Spectroscopy, 1991, 45, 380-389.

Burack, W. R. et Biltonen, R. L. Lipid bilayer heterogeneities and modulation of phospholipase A2 activity. Chem. Phys. Lipids, 1994, 73, 209-222.

Bush, S. F., Levin, H. et Levin, I. W. Cholesterol-lipid interactions: an infrared and Raman spectroscopic study of the carbonyl stretching mode region of 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers. Chem. Phys. Lipids, 1980, 27, 101-111.

Casal, H. L. et Mantsch, H. H. Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 779, 381-401.

Casey, R. P. Membrane reconstitution of the energy-conserving enzymes of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 768, 319-347.

Cevc, G. et Marsh, D. Phospholipid bilayers. Physical principles and models, New York: A Wiley-Interscience publication, Inc. 1987.

Cho, W., Tomasselli, A. G., Heinrickson, R. L. et Kezdy, F. J. The chemical basis for interfacial activation of monomeric phospholipase A2. Autocatalytic derivatization of the enzyme by acyl transfer from substrate. J. Biol. Chem., 1988, 263, 11237-11241.

Clague, M. J. et Cherry, R. J. Comparison of p25 presequence peptide and melittin in red blood cell hemolysis and band3 aggregation. Biochem. J., 1988, 252, 791-794.

Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A. et Lin, L-L. Cytosolic phospholipase A2. Lipid Mediators Cell Signalling, 1995, 12, 83-117.

Clarke, P.E. Introduction to surfactant analysis, D.C. Cullum, editeur, Blackie Academic & Professional, London. 266-276. 1994.

Conricode, K. M. et Ochs, R. Mechanism for the inhibitory and stimulatory actions of proteins on the activity of phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta, 1989, 1003, 36-43.

Cornell, R. B. et Arnold, R. S. Modulation of the activities of enzymes of membrane lipid metabolism by non-bilayer forming lipids. Chem. Phys.

Lipids, 1996, 81, 215-227.

Cornut, I., Büttner, K., Dasseux, J.-L. et Dufourcq, J. The amphipathic alpha-helix concept. Application to the de novo design of ideally amphipathic Leu, Lys peptides with hemolytic activity higher than that of melittin. FEBS Lett., 1994, 349, 29-33.

Cornut, I., Desbat, B., Turlet, J. M. and Dufourcq, J. In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface. Biophys. J., 1996, 70, 305-312.

Cullis, P. R., Hope, M. J. et Tilcock, C. P. S. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. Chem. Phys. Lipids, 1986, 40, 127-144.

Curatolo, W. et Neuringer, L. J. The effects of cerebroside on model membrane shape. J. Biol. Chem., 1986, 261, 17177-17182.

Deamer, D.W. et Bramhall, J. Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. Chem. Phys. Lipids, 1986, 40, 167-188.

Demel, R.A., Van Deenen, L.L.M. and Pethica, B.A. Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol. Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 11-19.

Dempsey, C. E. The actions of melittin on membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1031, 143-161.

Dennis, E. A. Phospholipases. The enzymes. New York: P. D, Boyer. Ed., vol 16, pp.307-353. Academic press. 1983.

Devlin, T. M. Textbook of Biochemistry: With clinical correlations. New York: Wiley-Liss, inc. 1993.

Dijkstra, B. W., Colk, K. H., Hol, W. G. J. et Drenth, J. J. Mol. Biol., 1981, 147, 97-123.

Dijkstra, B. W., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. and Drenth, J. Structure of bovine pancreatic phospholipase A2 at 1.7 resolution. J. Mol. Biol., 1981, 147, 97-123.

Dluhy, R. A., Cameron, D. G., Mantsch, H. H. and Mendelsohn, R. Fourier transform infrared spectroscopic studies of the effect of calcium ions on phosphatidylserine. Biochemistry, 1983, 22, 6318-6325.

Eisenman, J. et Dani, J. A. An introduction to molecular architecture and permeability of ion channel. Ann. Rev. Biophys. Chem., 1987, 16, 205-226.

El-Sayed, M. Y. et Roberts, M. F. Charged detergents enhance the activity of phospholipase C (bacillus cereus) towards micellar short-chain phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 831, 133-141.

Faucon, J.-F., Bonmatin, J.-M., Dufourcq, J. et Dufourc, E. J. Acyl chain length dependence in the stability of melittin-phosphatidylcholine complexes. A light scattering and ³¹P-NMR study. Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1234, 235-243.

Frey, S. et Tamm, L. K. Orientation of melittin in phospholipids bilayers. Biophys. J. 1991, 60, 922-930.

Gaines, G. L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. New York: Interscience publisher, a division of John Wiley and Sons, Inc. 1966.

Gennis, R. B. Biomembranes, molecular structure and fonction. New York: Springer-Verlag. 1989.

Gericke, A., et Hühnerfuss, H. IR reflection absorption spectroscopy: a versatile tool for studying interfacial enzymatic processes. Chem. Phys. Lipids, 1994a, 74, 205-210.

Gericke, A., et Hühnerfuss, H. The effect of cations on the order of saturated fatty acid monolayers at the air-water interface as determined by infrared reflection-absorption spectrometry. Thin Solid Films, 1994b, 245, 74-82.

Gething, M.-J., Doms, R. W. et White, J. Studies on the mechanism of membrane fusion: Site-specific mutagenesis of the Haemagglutinin of influenza virus. J. Cell. Biol., 1986, 102, 11-23.

Gorter, E. et Grendel, F. On biomolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. J. Exp. Med., 1925, 41, 439.

Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H. et Salesse, C. An enzyme caught in action: direct imaging of hydrolytic function and domain formation of phos-

phospholipase A2 in phosphatidylcholine monolayers. FEBS Lett., 1989, 252, 73-82.

Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H. et Salesse, C. Hydrolytic action of phospholipase A2 in monolayers in the phase transition region: direct observation of enzyme domain formation using fluorescence microscopy. Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1023, 365-379.

Grandbois, M., Desbat, B. et Salesse, C. Monitoring of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase A2 by use of polarization-modulated FTIR spectroscopy. Biophys. J., 1996a, (soumis pour publication).

Grandbois, M., Desbat, B., Blaudez, D. et Salesse, C. PM-IRRAS measurement of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase C. Langmuir, 1996b, (soumis pour publication).

Grandbois, M., Salesse, C. et Dufourcq, J. Study of the synergistic action of phospholipase A2 and melittin in the hydrolysis of phospholipid monolayers. Thin Solid Films, 1996c, 284,285, 743-747.

Guy, H. R. et Hucho, F. The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor. Trends Neurosciences, 1987, 10, 318-321.

Hansen, S., Hansen, L. K. et Hough, E. The crystal structure of tris inhibited phospholipase C from *Bacillus Cereus* at 1.9 Å resolution. J. Mol. Biol., 1993, 231, 870-876.

Harvestick, D.M., Glaser, M. Visualization of Ca²⁺-induced phospholipid

domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 4475-4479.

Helenius, A. et Simons, K. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 415, 29-79.

Israelachvili, J. N. Physics of amphiphiles: micelles, vesicles and microemulsions. Amsterdam: North Holland. 1985.

Jain, M. J. Introduction to biological membranes. New York: John Wiley & sons. 1988.

Jain, M. K. et Berg, O. G. The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. Biochim. Biophys. Acta, 1989, 1002, 127-156.

Jain, M. K., Rogers, J., Jahagirdar, D. V., Marecek, J. F. et Ramirez, F. Kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 in intravesicle scooting mode and heterofusion of anionic and zwitterionic vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 860, 435-447.

Joos, P. and Demel, R. A. The interaction energies of cholesterol and lecithin in spread mixed monolayers at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 183, 447-457.

Kenneth, I. P. et Griffiths, P. R. Comparison of the amide I/II intensity ratio of solution and solid-state proteins sampled by transmission, attenuated total reflectance, and diffuse reflectance spectrometry. Appl. Spectroscopy, 1993, 47,

584-589.

Kouyama, T., Kouyama, A. N. et Ikegami, A. Bacteriorhodopsin is a powerful light-driven proton pump. Biophys. J., 1987, 51, 839-841.

Kupferberg, J. P., Yokoyama, S. and Kezdy, F. J. The kinetics of phospholipase A2-catalyzed hydrolysis of egg phosphatidylcholine in unilamellar vesicles. J. Biol. Chem., 1981, 256, 6274-6281.

Kupferberg, J. P., Yokoyama, S. et Kezdy, F. J. J. Biol. Chem., 1981, 256, 6274-6281.

Lafleur, M., Faucon, J.-F., Dufourcq, J. et Pézolet, M. Perturbation of binary phospholipid mixtures by melittin: a fluorescence and Raman spectroscopy study. Biochim. Biophys. Acta, 1989, 980, 85-92.

Laitinen, J., Lopponen, R., Merenmies, J. et Rauvala, H. Binding of laminin to brain gangliosides and inhibition of laminin-neuron interaction by the gangliosides. FEBS Lett., 1987, 217, 94-100.

Lamarche, F. Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières. 1988.

Lavigne, P., Tancrède, P., Lamarche, F., Grandbois, M. et Salesse, C. The organization of poly-benzyl-glutamate in the alpha-helical conformation at the air-water interface. Thin Solid Films, 1994, 242, 229-233.

Lehninger, A. L. Principles of biochemistry. New York, Worth Publishers, inc. 1982.

Lewis, K. A., Brian, J., Sweeney, A. et Roberts, M. F. Asymmetric short-chain phosphatidylcholines: defining chain binding constraints in phospholipase. Biochemistry, 1990, 29, 9962-9970.

Lewis, R. N. A. H., McElhaney, R. N., Pohle, W. and Mantsch, H. H. Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. Biophys. J., 1994 67, 2367-2375.

Maloney, K. M. et Grainger, D. W. Phase separated anionic domains in ternary mixed lipid monolayers at the air-water interface. Chem. Phys. Lipids, 1993, 65, 31-42.

Maloney, K.M., Grandbois, M., Salesse, C., Grainger, D.W. et Reichert, A. Phospholipase A2 interactions with model lipid monolayer membranes at the air-water interface. In Proteins at interfaces II; Fundamentals and applications, ACS Symposium Series 602, T.A. Horbett and J.L. Brash, editors, American Chemical Society, Washington. 490-504. 1995b.

Maloney, K.M., Grandbois, M., Salesse, C., Grainger, D.W. et Roberts, M. Phospholipase A2 domain formation in hydrolysed asymmetric phospholipid monolayers at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta, 1995a, 1235, 395-405 .

Maloney, K.M., Grandbois, M., Salesse, C., Grainger, D.W. et Reichert, A. Membrane microstructural templates for enzyme domain formation. L. Molecular Recognition, 1997 (sous presse).

Mantsch, H. H., Cameron, D. G., Tremblay, P. A. et Kates, M. Phosphatidylsulfocholine bilayers an infrared spectroscopic characterization of the polymorphic phase behavior. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 689, 63-72.

Marsh, D. Handbook of lipid bilayer. Boca Raton, CRC press. 1990.

Marshbanks, T.L., Ahn, J. A. et Franses, E. I. Transport and ion exchange in Langmuir-Blodgett films: Water transport and film microstructure by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. Langmuir, 1994, 10, 276-285.

McConnell, H. M., Tamm, L. K. et Weis, R. M. Periodic structures in lipid monolayer phase transition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 3249-3253.

Méthot, M. Aspects structuraux et fonctionnels de films de membranes pourpres. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières. 1996.

Mollay, C. et Kreil, G. Enhancement of bee venom phospholipase A2 activity by melittin, direct lytic factor from cobra venom and polymyxin B. FEBS Lett., 1974, 46, 141-144.

Monette, M. et Lafleur, M. Modulation of melittin-induced lysis by charge density of membranes. Biophys. J., 1995, 68, 187-195.

Moreau, H., Piéroni, G., Jolivet-Reynaud, C., Alouf, J. E. et Verger, R. A new kinetic approach for studying phospholipase C (*Clostridium perfringens* α toxin) activity on phospholipid monolayers. Biochemistry, 1988, 27, 2319-2323.

Murakami, M., Kudo, I. et Inoue, K. Secretory phospholipases A2. Lipid Mediators cell signalling, 1995, 12, 119-130.

Mushayakarara, E. and Levine, I.W. Determination of acyl chain conformation at the lipid interface region: Raman spectroscopic study of the carbonyl stretching mode region of dopalmitoyl phosphatidylcholine and structurally related molecules. J. Phys. Chem., 1982, 86, 2324-2327.

Nargessi, R. D. et Smith, D. S. Fluorometric assays for avidin and biotin. Methods Enzymol., 1986, 122, 67-72.

Paul, C. et Rosenbusch, J. P. Folding patterns of porin and bacteriorhodopsin. EMBO journal, 1985, 4, 1593-1597.

Peters, R., Beck, K. Translational diffusion in phospholipid monolayers measured by fluorescence microphotolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 7183-7187.

Phillips, M.C., Hauser, H., Leslie, R.B and Olman, D. A comparison of the interfacial interactions of the apoprotein from high density lipoprotein and B-casein with phospholipids. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 406, 402-414.

Piéroni, G., Gargouri, Y., Sarda, L. et Verger, R. Interactions of lipases with lipid monolayers. Facts and questions. Adv. Colloid Interface Sci., 1990, 32, 341-378.

Pomerleau, V., Harvey-Girard, E. et Boucher, F. Lipid-protein interaction in the purple membrane: structural specificity within the hydrophobic domain. Biochem. Biophys. Acta, 1995, 1234, 221-224.

Rao, N. M. Differential susceptibility of phosphatidylcholine small unilamellar vesicles to phospholipases A2, C and D in the presence of membrane active peptides. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1992, 182, 682-688.

Rao, N. M. et Sundaram, C. S. Sensitivity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) activity to lipid packing in sonicated lipid mixtures. Biochemistry, 1993, 32, 8547-8552.

Reichert, A., Ringsdorf, H. et Wagenknecht, A. Spontaneous domain formation of phospholipase A2 at interfaces: fluorescence microscopy of the interaction of phospholipase A2 with mixed monolayers of lecithin, lysolecithin and fatty acid. Biochim. Biophys. Acta, 1992, 1106, 178-88.

Rhee, S. G., Suh, P-G., Ryu, S-H. et Lee, S. Y. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. Science, 1989, 244, 546-550.

Romero, G., Thompson, K. et Biltonen, R. L. The activation of porcine pancreatic phospholipase A2 by dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles. J. Biol. Chem., 1987, 262, 13476-13482.

Ruoslahti, E. et Pierschbacher, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science, 1987, 238, 491-497.

Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H. et Sigler, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. Science, 1990, 250, 1541-1546.

Shipley, G.G. Recent X-ray diffraction studies of biological membrane components. D. Chapman et D. F. H. Wallach, Eds, Biological membranes, Vol. 2, pp. 1-89. Academic press. New York 1973.

Singer, S. J. et Nicholson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972, 175, 720-731.

Stein, W. D. Transport and diffusion across cell membranes. Academic Press, New York, 1986.

Tackett, J. E. FTIR characterization of metal acetates in aqueous solution. Appl. Spectroscopy, 1989, 43, 483-489.

Terwilliger, T. C., Weissman, L. et Eisenberg, D. The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. Biophys. J., 1982, 37, 353-361.

Tosteson, M. T., Levi, J. V., Caporale, L. H., Ronsenblatt, M. et Tosteson, D. C. Solid-phase synthesis of melittin: purification and functional characterization. Biochemistry, 1987, 26, 6627-6631.

Van den Bosch, H. Intracellular phospholipases A. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 604, 191-246.

van Hoogevest, P., de Gier, J. et de Kruijff, B. Determination of the size of the packing defects in dimyristoylphosphatidylcholine bilayer present at the phase transition temperature. FEBS Lett., 1984, 171, 160-164.

Verger, R. et de Hass, G. H. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. Annual Rev. Biophys. Bioengineering, 1976, 5, 77-117.

Verger, R. et Rivière, C. Les enzymes lipolytiques: une étude cinétique. Revue Française des Corps Gras, 1987, 1, 7-13.

Verheij, H.M., Slotboom, A. J. et de Hass., G.H. Structure and function of phospholipase A2. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol, 1981, 91, 91-199.

Vernon, L. P. et Bell, J. D. Membrane structure toxins and phospholipase A2 activity. Pharmac. Ther., 1992, 54, 269-295.

Waite, M. The phospholipase (Handbook of lipid research, Vol 5), New York, Plenum Press. 1978.

Walter, A. et Gutknecht, J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. J. Membrane Biol., 1986, 90, 207-217.

Zhou, F. et Shulten, K. Molecular dynamics study of phospholipase A2 on a