

MARISE OUELLET

**ÉTUDE DES MÉCANISMES DE PERTURBATION
MEMBRANAIRE DE PEPTIDES AMPHIPHILES PAR
SPECTROSCOPIES DE RMN À L'ÉTAT SOLIDE ET
INFRAROUGE**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en chimie
pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE CHIMIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

Résumé

Cette thèse porte sur la détermination des mécanismes de perturbation membranaire de peptides amphiphiles synthétiques de 14 et 21 acides aminés par spectroscopies de RMN à l'état solide et infrarouge. Des études antérieures ont démontré que les peptides 14- et 21-mères possèdent des activités membranaires s'apparentant à celles observées pour les peptides antimicrobiens naturels et leurs analogues. Dans le but de mieux comprendre la nature des interactions impliquées dans leurs modes d'action, et ainsi faire le design et la synthèse de peptides synthétiques possédant une activité antimicrobienne sélective, nous avons étudié les peptides 14- et 21-mères en interaction avec différentes membranes lipidiques modèles. Les membranes modèles utilisées dans cette étude sont les vésicules multilamellaires zwitterioniques et anioniques, les bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre et les bicelles.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des peptides 14- et 21-mères sur la conformation des têtes polaires et l'ordre orientationnel des chaînes acyle des phospholipides constituant les membranes modèles par spectroscopie de RMN du phosphore-31 et du deutérium. Ces résultats ont révélé que les peptides modèles perturbent davantage la région polaire des bicouches lipidiques, et ont un effet moindre sur les chaînes acyle des lipides.

Nous avons également déterminé par spectroscopie de RMN de l'azote-15 que les peptides 14- et 21-mères adoptent une orientation en surface des bicouches orientées entre des plaques de verre. Des mesures de distances hétéronucléaires intermoléculaires ont également confirmé la proximité du peptide 14-mère avec les têtes polaires des lipides DMPC.

Dans un dernier temps, nous avons étudié les interactions membranaires et la diffusion rotationnelle du peptide 21-mère en interaction avec des bicelles par RMN ^{31}P , ^2H et ^{15}N . Les résultats ont révélé que le peptide 21-mère stabilise la structure des bicelles et n'adopte pas une distribution circulaire d'orientation dans le plan des bicelles. Finalement, la dynamique du peptide 21-mère incorporé à des vésicules multilamellaires de DMPC a

été étudiée par des expériences en RMN du carbone-13 via l'analyse du nombre et de l'intensité des bandes de rotation, et ces analyses ont révélé que le peptide 21-mère est immobilisé dans son interaction membranaire.

Abstract

This thesis is related to the determination of the membrane perturbation mechanisms of 14 and 21 amino acid amphipathic synthetic peptides by solid-state NMR and infrared spectroscopies. Previous studies have shown that the 14- and 21-mer peptides exhibit membrane activities similar to those observed for natural antimicrobial peptides and their related analogues. To better understand the type of interactions that are involved in the modes of membrane perturbation of the 14- and 21-mer peptides, and then to plan the design and synthesis of synthetic peptides with selective antimicrobial activity, we have studied the interaction between the peptides and a variety of model membranes. The types of model membranes used in these studies are zwitterionic and anionic multilamellar vesicles, oriented bilayers stacked between glass plates and bicelles.

We first investigated the effects of the 14- and 21-mer peptides on the conformation of polar headgroups and orientational order of lipid acyl chains by phosphorus-31 and deuterium NMR spectroscopy. The results reveal that the 14- and 21-mer model peptides perturb to a greater extent the polar region of phospholipid bilayers, and to a lesser extent the lipid hydrophobic acyl chains.

Nitrogen-15 NMR results indicate that the 14- and 21-mer peptides reside at the surface of bilayers stacked between glass plates. Also, intermolecular heteronuclear distance measurements confirm the proximity of the 14-mer peptide to DMPC lipid polar headgroups.

We have also studied the membrane interaction and rotational diffusion of the 21-mer peptide in interaction with bicelles by ^{31}P , ^2H and ^{15}N NMR. The results reveal that the 21-mer peptide stabilizes the bicelle structure and do not show a circular orientational distribution in the bicelle planar region. Finally, the 21-mer peptide dynamics has been studied by ^{13}C NMR experiments via the analysis of the number and intensity of spinning sidebands, and the results suggest that the 21-mer peptide is immobilized upon binding.

Avant-Propos

Cette thèse décrit l'étude des interactions membranaires de deux peptides amphiphiles synthétiques de 14 et 21 acides aminés dans le but de déterminer leurs mécanismes d'action. Le premier chapitre décrit la problématique et les aspects biologiques qui ont motivé le projet, et présente le cœur de cette étude, soit les peptides synthétiques 14- et 21-mères. Le deuxième chapitre énonce les fondements théoriques essentiels à la compréhension et à l'analyse des résultats expérimentaux. Les résultats obtenus dans ce travail sont présentés aux chapitres 3 à 6 sous la forme d'articles scientifiques que j'ai rédigés en tout ou en partie, et en collaboration avec les professeurs Michèle Auger et Normand Voyer. Les contributions des co-auteurs de chaque article sont décrites ci-dessous.

Le premier article, publié dans la revue *Biochimica et Biophysica Acta* à l'hiver 2006 (Ouellet, M., Otis, F., Voyer, N., Auger, M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1758**: 1235-1244), constitue le chapitre 3. Cet article rapporte l'ensemble des expériences biophysiques antérieures réalisées sur les peptides 14- et 21-mères. La première section est dédiée aux études conformationnelles et d'activité membranaire des peptides 14- et 21-mères. Ces études ont été réalisées dans le laboratoire du professeur Normand Voyer durant les années 1997-2004 par François Otis lors de ses études de maîtrise et par Éric Biron lors de ses études de maîtrise et de doctorat. Cette première partie a été écrite par François Otis, actuellement professionnel de recherche dans le laboratoire du professeur Normand Voyer. La deuxième section de l'article porte sur l'étude des interactions membranaires des peptides 14- et 21-mères par RMN du phosphore-31 et du deutérium, dont j'ai réalisé les expériences et l'analyse des résultats. Cet article est une introduction générale sur les activités membranaires des peptides 14- et 21-mères et un point de départ aux études spectroscopiques présentées dans cette thèse.

Le deuxième article, présenté au chapitre 4, a été publié dans la revue *Biophysical Journal* à l'été 2006 (Ouellet, M., Bernard, G., Voyer, N., Auger, M. (2006) *Biophys. J.*, **90**: 4071-4084). Cet article présente les résultats obtenus pour les peptides 14- et 21-mères en interaction avec des systèmes lipidiques non orientés de composition variable par RMN

du phosphore-31 et du deutérium, de même que par spectroscopie IR-TF. Geneviève Bernard a effectué les expériences de spectroscopie infrarouge dans le cadre d'un stage de recherche effectué dans le laboratoire du professeure Michèle Auger à l'été 2004. Ma contribution à cet article se rapporte à la réalisation des travaux en RMN du phosphore-31 et du deutérium, à l'analyse des résultats en RMN et en infrarouge et à la rédaction entière de l'article.

Le troisième article, dont j'ai fait la rédaction entière, constitue le chapitre 5. Cet article a été publié dans la revue *Biochemistry* à l'été 2007 (Ouellet, M., Doucet, J.-D., Voyer, N., Auger, M. (2007) *Biochemistry* **46**: 6597-6606). J'ai réalisé la totalité des travaux de RMN et l'analyse se rapportant à ceux-ci. Cet article porte sur la détermination de la topologie membranaire du peptide 14-mère dans des systèmes membranaires orientés par RMN du phosphore-31, du deutérium et de l'azote-15, de même que sur la mesure des distances hétéronucléaires intermoléculaires par la technique « *REDOR* ». La majorité des synthèses et des purifications des peptides 14-mères non marqués et sélectivement marqués à l'azote-15 revient à Jean-Daniel Doucet. Jean-Daniel a réalisé ces travaux lors d'un stage de recherche effectué dans le laboratoire du professeur Normand Voyer à l'été 2005. Avec l'aide de Pierre Audet, professionnel de recherche au département de chimie, j'ai fait le développement et la mise au point des expériences de RMN portant sur les systèmes lipidiques orientés.

Le dernier article, en préparation, porte sur les interactions membranaires du peptide modèle « canal ionique » de 21 acides aminés avec les membranes modèles bicelles et les bicouches orientées entre des plaques de verre, de même que sur la dynamique de ce peptide en interaction avec des vésicules lipidiques non orientées. J'ai réalisé la totalité des expériences en RMN, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article.

Parallèlement à ces quatre articles originaux, deux articles de revue portant sur l'étude des peptides antimicrobiens par spectroscopie de RMN à l'état solide ont été écrits dans un intervalle de deux ans. Ces articles rapportent plusieurs exemples récents tirés de la littérature sur les interactions lipides/peptides. Le premier article a été publié dans *Handbook of Modern Magnetic Resonance* à l'automne 2006 (Ouellet, M., Auger, M. (2006) *Handbook of Modern Magnetic Resonance*, Graham A. Webb Ed., Springer,

Dordrecht, pp.263-269), et le second article sera publié dans *Annual Report on NMR Spectroscopy* (Ouellet, M., Auger, M. (2007) *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, Graham A. Webb Ed., Springer, Dordrecht, vol.63). Le cœur de ces articles est divisé en deux grandes sections: l'étude des membranes et l'étude des peptides antimicrobiens. Plus spécifiquement et à l'aide d'exemples, nous rapportons l'utilité des expériences en RMN du phosphore-31 et du deutérium dans l'étude des effets des peptides antimicrobiens sur les membranes lipidiques modèles. Nous décrivons également les expériences les plus communes employées pour les études structurales, de même que pour les études de topologie membranaire et de dynamique des peptides antimicrobiens en interaction avec des membranes lipidiques.

Remerciements

Tout le travail présenté dans cette thèse, ainsi que les chemins qui ont mené à son accomplissement, n'auraient pas la même importance et la même valeur à mes yeux sans le support et l'amour de personnes qui me sont très chères.

J'aimerais souligner toute la reconnaissance que je porte envers ma directrice de thèse, Michèle Auger, et mon co-directeur, Normand Voyer. Vous représentez à mes yeux l'équilibre parfait dans la conciliation que vous faites de vos vies familiales et de vos nombreux projets de carrière.

Michèle, je te remercie du fond du cœur de m'avoir accueillie dans ton labo et de m'avoir fait confiance durant toutes ces belles années. Tu m'as donné la latitude dont j'avais besoin pour m'accomplir dans mon travail, ce degré de liberté qui fait qu'on veut toujours aller plus loin. Tu es toujours présente et entière, avec l'oreille attentive et les paroles réconfortantes dans les moments plus difficiles, et avec les encouragements dans nos belles réalisations. Mille fois je te remercie Michèle! Merci à toi Normand pour ton enthousiasme et ton dynamisme contagieux! Nos rencontres se sont toujours avérées énergisantes et empreintes de défis toujours plus stimulants. Michèle et Normand, merci pour le magnifique projet et la complicité développée au fil des ans.

Une grande partie des travaux n'auraient pu voir le jour sans la précieuse aide de Pierre. Merci pour ta patience et ton ingéniosité dans la mise au point de nouvelles expériences! Tu as toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses(!) questions sur le-pourquoi-du-comment!! Au fil des ans, tu m'as transmis le goût de toujours en savoir plus, de comprendre ce qui se passe derrière le rideau. Je garde de bons souvenirs de nos discussions, et je repars avec un riche bagage de connaissance. Merci!

J'ai également eu l'opportunité de côtoyer des personnes extraordinaires évoluant dans le laboratoire de Michèle Auger. Chaque personne a su, à sa manière, ensoleiller mes nombreuses heures passées au labo. Jeff, tu seras toujours un exemple de ponctualité et de rigueur, et avec toi dans le labo, plus besoin d'horloge! Jérémie, le dj du labo, merci

d'égayer nos dîners de ta musique colorée! Ne cesse jamais d'alimenter ta curiosité et ta passion pour la science, et ne cesse jamais de te questionner. Lévi-Strauss disait: « Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses; c'est celui qui pose les vraies questions ». Merci à toi, Francis, pour ton calme apaisant, et pour les nombreuses discussions tout aussi divertissantes les unes des autres. Un merci tout spécial à Geneviève avec qui j'ai eu la chance de travailler étroitement sur le projet. Ta rigueur et ton goût du travail bien fait font de toi une chercheuse exceptionnelle! Je ne voudrais surtout pas oublier les nombreux étudiants d'été qui apportent, à chaque année, un vent de fraîcheur.

Un clin d'œil tout spécial à mes collègues du deuxième, les membres du labo Pézolet! Sans votre présence et vos rires, les gâteaux n'auraient pas eu la même saveur délicieuse, et les discussions qui s'en suivaient n'auraient pas été aussi colorées! Un merci tout aussi important à Serge Groleau pour son aide lors des expériences en infrarouge.

Merci à vous, Mélanie et François, professionnels de recherche dans le laboratoire Voyer. Indispensables et disponibles, vous tenez le fort comme personne. Merci pour votre aide et votre bonne humeur! C'est toujours un plaisir de rendre visite à ma deuxième famille scientifique, Mélanie, François, Pierre-Luc, Simon, Mathieu, Jean-Philippe, tous les étudiants d'été ainsi que ceux qui nous ont quittés! Une pensée toute spéciale pour Jean-Daniel sans qui les dernières synthèses peptidiques n'auraient pas été aussi fructueuses. Merci à vous de m'avoir fait apprécier les joies de la synthèse organique! J'en garde d'excellents souvenirs!

Au fil des ans, j'ai noué de précieuses amitiés avec des personnes exceptionnelles. Merci à toi Isabelle pour cette belle et profonde amitié et pour tous les moments passés ensemble devant une bonne pizza! Merci pour les pauses improvisées de fins d'après-midi où tout était permis! Parfois silencieuse, parfois éclatante, et toujours présente pour ceux que tu aimes. Tant de confidences sont ancrées dans les murs de notre « cocron », j'en conserve le précieux souvenir dans mon cœur...merci! Souriante, attentionnée et douce, Catherine, nos moments passés ensemble ici me manqueront énormément. Tu attires le bonheur autour de toi et on se sent bien en ta présence...merci. Mike, fidèle et authentique ami, tu me connais mieux que personne! Nous avons traversé de nombreux événements ensemble et passé au travers de remises en question...Et nous avons toujours écouté notre

cœur, et il nous a conduit vers les bons choix...Merci pour ta présence, ton écoute et ton amitié.

Papa, maman, Sandra et toute ta petite famille, vous aurez toujours une place dans mon cœur. Je ne vous remercierai jamais assez de tout le support et l'écoute que vous m'avez manifestés tout au long de ces années. Bien souvent j'ai eu le sentiment de vous négliger dans les moments où le travail exigeait beaucoup, mais vous étiez toujours là, compréhensifs et attentionnés. Merci à vous tous d'exister et d'être ce que vous êtes.

Benoît, ma tendre moitié, ma meilleure moitié! Ta confiance en moi, en nous et en la vie m'aide à être meilleure de jour en jour. Merci de partager ma vie, de m'accepter dans la tienne, et de faire en sorte que chaque moment à tes côtés soit toujours plus merveilleux que les précédents. Je t'aime.

J'aimerais dans un dernier temps remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), le Centre de Recherche en Sciences et Ingénierie des Macromolécules (CERSIM) et le Centre de Recherche sur la Fonction, la Structure et l'Ingénierie des Protéines (CREFSIP). Par leur support financier, ils ont contribué à la réalisation des travaux présentés dans cette thèse.

À mes parents.

« C'est là ce qu'ont de beau les sciences naturelles:
elles ne veulent rien prouver. »

Flaubert (1821-1880)

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Avant-Propos	v
Remerciements.....	viii
Table des matières	xii
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des figures	xix
Liste des abréviations.....	xxvi
Chapitre 1.....	1
Introduction.....	1
1.1 Résistance aux antibiotiques	1
1.2 Peptides antimicrobiens à activité membranaire	2
1.2.1 Caractéristiques des peptides antimicrobiens naturels.....	2
1.2.2 Sélectivité des peptides antimicrobiens	4
1.3 Mécanismes de perturbation membranaire	9
1.3.1 Désintégration de la membrane lipidique	10
1.3.2 Formation de pores membranaires	11
1.3.2.1 Modèle « barrel-stave »	11
1.3.2.2 Modèle « toroïdal »	12
1.4 Peptides synthétiques à activité membranaire	13
1.4.1 Paramètres structuraux	14
1.4.2 Peptides amphiphiles modèles 14- et 21-mères.....	17
1.4.2.1 Historique des peptides 14- et 21-mères.....	18
1.5 Membranes biologiques.....	21
1.5.1 Phospholipides et cholestérol.....	24
1.5.1.1 Structure.....	24
1.5.1.2 Susceptibilité magnétique.....	26
1.5.2 Organisation lipidique.....	28
1.5.3 Dynamique membranaire.....	30
1.5.4 Systèmes de membranes modèles.....	31
1.5.4.1 Vésicules multilamellaires.....	31
1.5.4.2 Bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre	32
1.5.4.3 Bicelles.....	33
1.6 Objectifs spécifiques.....	36

Chapitre 2.....	39
Spectroscopies de résonance magnétique nucléaire et infrarouge pour l'étude des interactions lipides/peptides.....	39
2.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide	40
2.1.1 Concepts fondamentaux.....	40
2.1.1.1 Moment angulaire de spin et aimantation nucléaire	40
2.1.1.2 Effet du champ magnétique et fréquence de Larmor.....	41
2.1.1.3 Impulsion de radiofréquence et relaxation.....	44
2.1.2 Interactions de spins nucléaires en RMN à l'état solide	46
2.1.2.1 Interaction de Zeeman	47
2.1.2.2 Interaction de déplacement chimique	48
2.1.2.3 Interaction dipolaire.....	49
2.1.2.4 Interaction quadrupolaire.....	50
2.2 Étude de RMN des membranes lipidiques.....	50
2.2.1 RMN du phosphore-31	51
2.2.1.1 Principes de base.....	51
2.2.1.2 Spectres de RMN ³¹ P de systèmes lipidiques	54
2.2.1.3 Séquence d'impulsions « Écho de Hahn »	57
2.2.2 RMN du deutérium	58
2.2.2.1 Principes de base	58
2.2.2.2 Spectres de RMN ² H de systèmes lipidiques.....	61
2.2.2.3 Séquence d'impulsions « Écho quadrupolaire».....	63
2.3 Étude de RMN des peptides.....	64
2.3.1 Contraintes orientationnelles	66
2.3.1.1 RMN de l'azote-15	66
2.3.1.2 Polarisation croisée	70
2.3.2 Contraintes de distances internucléaires	71
2.3.2.1 Rotation à l'angle magique (MAS).....	72
2.3.2.2 Technique « Rotational-Echo Double Resonance »	73
2.3.2.3 Conditions expérimentales.....	76
2.3.3 Dynamique membranaire.....	77
2.3.3.1 RMN du carbone-13	77
2.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	79
2.4.1 Étude par IR-TF des systèmes biologiques.....	80
2.4.2 Vibration d'élongation du groupement carbonyle des lipides	82
Chapitre 3.....	84
Biophysical Studies of the Interactions between 14-mer and 21-mer Model Amphipathic Peptides and Membranes: Insights on their Modes of Action	84
3.1 Résumé.....	84
3.2 Abstract.....	85

3.3	Introduction.....	85
3.4	Model amphipathic peptides containing crown ethers	88
3.5	Conformation of the 14-mer and 21-mer peptides.....	90
3.6	Transport and lytic activity of the 14-mer and 21-mer peptides.....	92
3.6.1	pH-stat.....	92
3.6.2	Monomolecular membrane conductivity	93
3.6.3	²³ Na NMR	93
3.6.4	Fluorescence studies	94
3.7	Effects of the 14-mer and 21-mer peptides on model membranes	95
3.7.1	³¹ P NMR spectroscopy.....	96
3.7.2	² H NMR spectroscopy	99
3.8	Proposed mechanisms of action.....	101
3.9	Conclusions.....	103
3.10	Acknowledgements.....	103
	Chapitre 4.....	104
	Insights on the Interactions of Synthetic Amphipathic Peptides with Model Membranes as Revealed by ³¹ P and ² H Solid-State NMR and Infrared Spectroscopies	104
4.1	Résumé.....	104
4.2	Abstract.....	105
4.3	Introduction.....	105
4.4	Materials and methods	109
4.4.1	Materials	109
4.4.2	Peptide synthesis.....	110
4.4.3	Sample preparation: vesicles containing the 14-mer (21-mer) peptide	110
4.4.4	NMR experiments.....	111
4.4.5	FTIR experiments	111
4.5	Results and discussion	112
4.5.1	Solid-state NMR spectroscopy	112
4.5.1.1	Phosphorus-31 NMR	112
4.5.1.2	Deuterium NMR	122
4.5.2	Fourier transform infrared spectroscopy.....	127
4.5.3	Proposed mechanisms of membrane perturbation	131

4.6	Conclusions.....	133
4.7	Acknowledgements.....	133
Chapitre 5.....		135
Membrane Topology of a 14-mer Model Amphipathic Peptide: A Solid-State NMR Spectroscopy Study		135
5.1	Résumé.....	135
5.2	Abstract.....	136
5.3	Introduction.....	137
5.4	Materials and methods	140
5.4.1	Materials	140
5.4.2	Peptide synthesis.....	140
5.4.3	Sample preparation	141
5.4.3.1	Oriented bilayers stacked between glass plates	141
5.4.3.2	Lyophilized sample.....	141
5.4.4	NMR experiments.....	142
5.4.4.1	Static ^{31}P , ^2H and ^{15}N NMR experiments	142
5.4.4.2	REDOR experiments	143
5.5	Results and discussion	144
5.5.1	Peptide design.....	144
5.5.2	Solid-state NMR spectroscopy	145
5.5.2.1	Phosphorus-31 NMR	145
5.5.2.2	Deuterium NMR	150
5.5.2.3	Nitrogen-15 NMR.....	153
5.5.2.4	Distance measurement	155
5.5.3	Mechanism of membrane perturbation	157
5.6	Conclusions.....	160
5.7	Acknowledgements.....	161
5.8	Annexe au chapitre: Expérience d'échange bidimensionnelle en RMN ^{31}P	162
5.8.1	Matériel et méthodes.....	162
5.8.2	Résultats et discussion	163
Chapitre 6.....		166
Solid-State NMR Study of the Membrane Interactions of a 21-mer Cytotoxic Model Peptide.....		166
6.1	Résumé.....	166

6.2	Abstract.....	167
6.3	Introduction.....	167
6.4	Materials and methods.....	170
6.4.1	Materials.....	170
6.4.2	Peptide synthesis.....	171
6.4.3	Sample preparation.....	171
6.4.3.1	Bicelles.....	171
6.4.3.2	Oriented bilayers stacked between glass plates.....	172
6.4.3.3	Multilamellar vesicles.....	172
6.4.4	NMR experiments.....	173
6.4.4.1	Static ^{31}P and ^2H NMR experiments.....	173
6.4.4.2	Static ^{15}N NMR experiments.....	173
6.4.4.3	MAS ^{13}C NMR experiments.....	174
6.5	Results and discussion.....	175
6.5.1	Peptide design.....	175
6.5.2	Solid-state NMR spectroscopy.....	176
6.5.2.1	Phosphorus-31 NMR.....	176
6.5.2.2	Deuterium NMR.....	181
6.5.2.3	Nitrogen-15 NMR.....	184
6.5.2.4	Carbon-13 NMR.....	187
6.5.3	Model of membrane perturbation.....	190
6.6	Conclusions.....	192
6.7	Acknowledgements.....	192
	Chapitre 7.....	194
	Conclusion.....	194
7.1	Modes de perturbation membranaire des peptides 14- et 21-mères.....	195
7.2	Perspectives futures des peptides antimicrobiens.....	198
7.3	Orienter le design « antimicrobien » des peptides 14- et 21-mères.....	201
	Bibliographie.....	204

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Exemples de peptides antimicrobiens associés aux cinq classes structurales.....	4
Tableau 2.1: Spin, abondance naturelle, rapport gyromagnétique et fréquences de Larmor des noyaux étudiés pour divers champs magnétiques B_0	43
Tableau 2.2: Fréquences infrarouge (cm^{-1}) spécifiques aux divers groupements fonctionnels retrouvés dans les lipides et les peptides: ν_{as} et ν_s pour les mouvements d'élongation antisymétrique et symétrique, ν pour les mouvements d'élongation, ib pour les mouvements de déformation dans le plan, et d pour les mouvements de déformation.	80
Tableau 4.1: ^{31}P NMR spectral parameters for membrane vesicles in the absence and presence of peptides at different molar ratios. Measurements were taken at 37°C for lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.	114
Tableau 4.2: ^{31}P NMR spectral parameters of bicelles in the absence and presence of peptides. Measurements were taken at 33°C for a lipid/peptide molar ratio of 60:1. FWHM, full width at half-maximum.....	120
Tableau 4.3: Quadrupolar splittings and S_{CD} order parameters of DMPC- d_{54} for the plateau and methyl regions in DMPC and DMPC/cholesterol systems. Measurements were taken at 37°C in the absence and presence of the 14-mer and 21-mer peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1. The quadrupolar splittings have been measured on dePaked spectra.	124
Tableau 5.1: ^{31}P NMR spectral parameters for DLPC, DMPC, and DPPC bilayers in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.....	146
Tableau 5.2: Quadrupolar splittings and S_{CD} order parameters of DMPC- d_{54} and DPPC- d_{62} for the plateau and methyl regions in 0° oriented bilayers in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.	152
Tableau 6.1: ^{31}P NMR spectral parameters of bicelles in the absence and presence of the 21-mer peptide. DxPC represents DMPC or DPPC lipids. Data are reported at 35°C for DMPC bicelles, and at 40°C for DPPC bicelles. The lipid/peptide molar ratio is 60:1.....	179

Tableau 6.2: Quadrupolar splittings and S_{CD} order parameters of DMPC-d₅₄ and DPPC-d₆₂ bicelles at the plateau and methyl regions in the absence and presence of the 21-mer peptide. $\Delta\nu_Q$ and S_{CD} data are reported for DMPC and DPPC bicelles at 35°C and 40°C, respectively. The lipid/peptide molar ratio is 60:1.183

Liste des figures

- Figure 1.1:** Représentation graphique du peptide antimicrobien hybride CA(1-8)-ME(1-18). Les chaînes latérales des résidus lysine et autres résidus hydrophiles sont illustrées en rouge et en brun, et les chaînes latérales des résidus hydrophobes sont représentées en vert.3
- Figure 1.2:** Schémas des enveloppes de bactéries (a) Gram négative et (b) Gram positive, ayant les composantes suivantes: -1- Lipopolysaccharides (LPS), -2- Membrane externe, -3- Paroi de peptidoglycan, -4- Membrane cytoplasmique, -5- Acide lipotéichoïque, et -6- Acide téichoïque.5
- Figure 1.3:** (a) Structure de la couche de LPS. *Abe*: abequose, *Gal*: galactose, *Glc*: glucose, *GlcN*: glucosamine, *Hep*: heptulose, *KDO*: 2-céto-3-désoxyoctonate, *Man*: mannose, *NAG*: N-acétylglucosamine, *P*: phosphate, *Rha*: L-rhamnose. Structures des acides (b) lipotéichoïques et (c) téichoïques associés à la paroi de peptidoglycan chez les bactéries Gram positive.6
- Figure 1.4:** Modèle de désintégration membranaire « carpet-like ».10
- Figure 1.5:** Mécanisme de formation de pores membranaires « barrel-stave ».12
- Figure 1.6:** Mécanisme de formation de pores membranaires « toroïdal ».13
- Figure 1.7:** Structure commune des peptides 14- et 21-mères, et du groupement Boc. Le peptide 14-mère (n = 2) comporte un groupement OH en C-terminal et un groupement Boc en N-terminal. Le peptide 21-mère (n = 3) comporte un groupement OCH₃ en C-terminal et un groupement Boc en N-terminal.18
- Figure 1.8:** Projections en roues hélicoïdales des peptides (a) 14-mère et (b) 21-mère. Les résidus leucine hydrophobes (L) et phénylalanine portant les éthers en couronne (EC) sont représentés par les régions grises et blanches. Les positions indiquées par N et C sont les régions N- et C-terminales respectives.19
- Figure 1.9:** Schéma détaillé de la structure et des constituants d'une membrane biologique d'une cellule animale.22
- Figure 1.10:** Nature et proportion des principaux constituants membranaires des cellules humaines et microbiennes pour les milieux cytoplasmiques et exoplasmiques: CL pour cardiolipine, PG pour phosphatidylglycérol, PE pour phosphatidyléthanolamine, PC pour phosphatidylcholine, SM pour sphingomyéline, et ST pour cholestérol/ergostérol.23

Figure 1.11: (a) Structure générale des phospholipides: chaînes hydrocarbonées R_1 et R_2 associées au groupement glycérol; groupement glycérol; tête polaire X fixée au groupement phosphate. Têtes polaires (b) choline et (c) glycérol. (d) Exemple du phospholipide DMPG.	25
Figure 1.12: Structure du cholestérol.....	26
Figure 1.13: Organisations et morphologies des molécules lipidiques correspondantes: (a) phase micellaire avec morphologie conique inversée, (b) phase lamellaire simple et (c) phase lamellaire multiple avec morphologie cylindrique, et (d) phase hexagonale inverse avec morphologie conique	29
Figure 1.14: Mouvements des molécules de lipides à l'intérieur des membranes fluides et temps de corrélation moyens qui y sont associés.....	30
Figure 2.1: (a) Mouvement de précession des spins $\frac{1}{2}$ de rapport gyromagnétique positif et négatif autour du champ magnétique B_0 aligné selon l'axe z. (b) Transitions entre les niveaux d'énergie $-\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0$ et $+\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0$ correspondant aux états α et β pour un spin $\frac{1}{2}$	43
Figure 2.2: Excès de spins nucléaires dans le niveau d'énergie α générant une aimantation nette M_0 selon l'axe z, la direction du champ magnétique B_0	44
Figure 2.3: (a) Axes principaux du tenseur ADC par rapport au système d'axes principal (PAS) pour un atome de phosphore à la tête polaire des lipides. Les déplacements chimiques associés à chacun de ces éléments sont associés à un groupement phosphodiester statique. (b) Spectre de RMN ^{31}P de poudre d'un groupement phosphodiester statique.	52
Figure 2.4: Spectres de RMN ^{31}P (a) d'un groupement phosphodiester statique où $\sigma_{11} \neq \sigma_{22} \neq \sigma_{33}$, (b) d'un groupement phosphodiester à symétrie axiale où $\sigma_{11} \neq \sigma_{22} = \sigma_{33}$ animé d'un mouvement de rotation, et (c) d'un groupement phosphodiester à symétrie axiale où $\sigma_{11} \neq \sigma_{22} = \sigma_{33}$ animé de mouvements d'oscillation et de rotation.	54
Figure 2.5: Spectres de RMN ^{31}P caractéristiques (a) de vésicules multilamellaires, (b) de bicouches orientées entre des plaques de verre avec la normale à la bicouche parallèle au champ B_0 et (c) de bicelles.....	55
Figure 2.6: Séquence d'impulsions « Écho de Hahn ».....	57
Figure 2.7: Angles θ , β et γ reliant le vecteur C-D au système d'axes du laboratoire.	60

- Figure 2.8:** Effet des mouvements de rotation et d'oscillation sur l'allure des spectres de poudre en RMN ^2H : (a) Lipide statique, (b) Lipide animé d'un mouvement de rotation, et (c) Lipide animé de mouvements de rotation et d'oscillation.61
- Figure 2.9:** Spectres de RMN ^2H (a) de vésicules multilamellaires et (b) de bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre avec la normale à la bicouche parallèle au champ B_0 . Les écarts $\Delta\nu_Q$ maximal et minimal correspondent aux groupements CD_2 à la région plateau et aux groupements CD_3 à la région terminale.....62
- Figure 2.10:** Séquence d'impulsions « Écho quadrupolaire ».63
- Figure 2.11:** Structures des peptides (a) 14-mère et (b) 21-mère marqués sélectivement à l'azote-15 sur le résidu leucine en position 11 et 18; (c) Structure du peptide 21-mère doublement marqué sélectivement à l'azote-15/carbone-13 sur les résidus leucine en position 15/18.65
- Figure 2.12:** Orientation des principaux axes du tenseur ADC ^{15}N d'un groupement amide d'un acide aminé et valeurs moyennes des éléments σ_{11} , σ_{22} et σ_{33}67
- Figure 2.13:** Schéma illustrant la dépendance orientationnelle du déplacement chimique de l'élément σ_{33} du tenseur ADC du noyau ^{15}N par rapport au champ B_068
- Figure 2.14:** Schéma illustrant la diffusion rotationnelle d'un peptide incorporé à une bicouche lipidique dont la normale est orientée (a) parallèlement et (b) perpendiculairement au champ magnétique B_069
- Figure 2.15:** Séquence d'impulsions avec polarisation croisée. Le canal X est associé au noyau détecté.70
- Figure 2.16:** Réintroduction du couplage dipolaire hétéronucléaire sous les conditions de rotation à l'angle magique par l'application d'impulsions de radiofréquences synchronisées avec la période du rotor.73
- Figure 2.17:** Séquence d'impulsions « *REDOR XY-8* ».74
- Figure 2.18:** Courbe de déphasage universelle théorique « *REDOR* » illustrant la dépendance du signal déphasé $\Delta S/S_0$ en fonction du paramètre sans dimension λ75
- Figure 2.19:** Spectres de RMN ^{13}C (50,3 MHz) obtenus pour le groupement carbonyle de la glycine à l'état solide: (a) Statique, (b) À une vitesse MAS de 0,5 kHz, (c) 1,6 kHz, et (d) 2,1 kHz.78

- Figure 2.20:** Spectres infrarouge des régions caractéristiques des lipides de vésicules multilamellaires de DMPC: (a) Modes d'élongation CH_2 symétrique ($\nu_s \text{CH}_2$) et antisymétrique ($\nu_{as} \text{CH}_2$), (b) Modes d'élongation CD_2 symétrique ($\nu_s \text{CD}_2$) et antisymétrique ($\nu_{as} \text{CD}_2$), et (c) Mode d'élongation C=O ($\nu \text{C=O}$).....81
- Figure 2.21:** Spectres infrarouge de vésicules multilamellaires hydratées de DMPG enregistrés à trois températures différentes: (a) 15°C, (b) 23°C, et (c) 50°C. Les composantes en bleu et en vert sont associées aux groupements C=O libres (ν_f) et aux groupements C=O formant des liaisons hydrogène (ν_b).83
- Figure 3.1:** 7-mer, 14-mer and 21-mer peptides with different N-terminal and C-terminal groups. Unless indicated otherwise, the peptides investigated in the present study are the 14-mer peptide with $n = 2$ and $Y = \text{OH}$ (peptide B) and the 21-mer peptide with $n = 3$ and $Y = \text{OCH}_3$ (peptide C).89
- Figure 3.2:** CD spectra of the 14-mer and the 21-mer peptides in solution (TFE) at a concentration of 0.1 M, and bound to egg lecithin vesicles at a lipid/peptide molar ratio of 80:1.....91
- Figure 3.3:** Calcein leakage induced by the addition of the 14-mer and the 21-mer peptides (5 mM) to phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine (1:1) vesicles in HEPES 100 mM, NaCl 170 mM, EDTA 5 mM at pH 7.4. Vesicles were lysed with Triton X-100 at 400 s.95
- Figure 3.4:** Oriented ^{31}P solid-state NMR spectra of: (a) DLPC bilayers containing the 14-mer (*top trace*) and 21-mer (*bottom trace*) peptides; (b) DMPC bilayers containing the 14-mer (*top trace*) and 21-mer (*bottom trace*) peptides, at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 and at 37°C.98
- Figure 3.5:** Proposed models for the binding of the 14-mer (*left*) and 21-mer (*right*) peptides to DMPC bilayers. Those cartoons represent a static caption of the lipid/peptide interaction and are not drawn on scale. The 14-mer peptide is inserted in the hydrophobic core of the bilayer and adopts an in-plane orientation with the leucine hydrophobic side chains interdigitating the hydrocarbon lipid chains. In DMPC bilayers, the 21-mer peptide is in equilibrium between in-plane and transmembrane orientations that are consistent with previous single-channel conductivity and ATR studies.102
- Figure 4.1:** (a) Monoprotected 14-mer and diprotected 21-mer peptides used in this study. For the 14-mer peptide, $n = 2$ and $X = \text{OH}$. For the 21-mer peptide, $n = 3$ and $X = \text{OCH}_3$. (b) Three-dimensional view of the 14-mer peptide showing the aligned 21-crown-7-phenylalanines.108

- Figure 4.2:** ^{31}P NMR spectra of (a) zwitterionic DMPC, (b) anionic DMPG, and (c) zwitterionic DMPC/cholesterol membranes at 37°C in the absence and presence of the 14-mer (*top row*) and 21-mer (*bottom row*) peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.....113
- Figure 4.3:** (a) ^{31}P static and (b) ^2H NMR spectra of bicelles at 33°C in the absence and presence of the 14-mer (*top row*) and 21-mer (*bottom row*) peptides at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.....119
- Figure 4.4:** ^2H NMR spectra of the zwitterionic (a) DMPC and (b) DMPG/cholesterol membranes at 37°C in the absence and presence of the 14-mer (*top*) and 21-mer (*bottom*) peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.....123
- Figure 4.5:** FTIR spectra of the C=O stretching bands of zwitterionic and anionic membranes at 15°C and 50°C : (a-d) DMPC, (b-e) DMPG and (c-f) DMPC/cholesterol vesicles in the absence and presence of the 14-mer (*top*) and 21-mer (*bottom*) peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.....130
- Figure 5.1:** Monoprotected 14-mer peptide used in the present study. The ^{15}N -labeled leucine residue marked by an asterisk is located in the first heptamer at position 4.....138
- Figure 5.2:** ^{31}P NMR spectra of mechanically oriented lipid bilayers of (a) DLPC and (b) DMPC at 37°C , and (c) DPPC at 50°C , in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.....147
- Figure 5.3:** ^2H NMR spectra of mechanically oriented lipid bilayers of (a) DMPC at 37°C , and of (b) DPPC at 50°C , with the bilayer normal parallel (*top row*) and perpendicular (*bottom row*) to the magnetic field direction in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.....151
- Figure 5.4:** ^{15}N NMR spectra of the 14-mer peptide incorporated in mechanically oriented lipid bilayers of (a) DLPC and (b) DMPC at 37°C and (c) DPPC at 50°C at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.....154
- Figure 5.5:** 40.5-MHz $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR dephasing ($\Delta S/S_0$) for the 14-mer peptide in lyophilized DMPC multilamellar vesicles at a lipid/peptide molar ratio of 60:1. The spinning speed was 3800 Hz. The solid line is the best fit to the experimental $\Delta S/S_0$ values and corresponds to a mean internuclear ^{15}N - ^{31}P distance of $7.6 \pm 0.6 \text{ \AA}$. The dotted lines illustrate the distribution of distances.....156

- Figure 5.6:** Cross-sectional views of (a) cylindrical PC, (b) cone-shaped PE, (c) inverse-cone shaped LPC, (d) inverse-cone shaped 14-mer peptide, and (e) the positive curvature strain and membrane destabilization imposed by the 14-mer peptide laid at the bilayer surface.....158
- Figure 5.7:** ^{31}P (*top row*) and ^2H (*middle row*) NMR spectra of DMPC mechanically oriented lipid bilayers in the absence and presence of the 14-mer peptide and ^{15}N (*bottom row*) NMR spectra of the 14-mer peptide incorporated in DMPC mechanically oriented lipid bilayers. The spectra were acquired at 37°C and at a lipid/peptide molar ratio of 20:1.....159
- Figure 5.8:** Distance parcourue par un lipide lors de la diffusion latérale (a) dans une vésicule multilamellaire et (b) dans le pore toroïdal d'une bicouche lipidique plane.....164
- Figure 5.9 :** Spectres d'échange 2D en RMN ^{31}P pour des bicouches orientées de DMPC à des temps d'échange de 100 μs , 1 ms et 5 ms.164
- Figure 6.1:** (a) Diprotected 21-mer peptide structure used in this study. (b) Edmundson wheel projection showing the amphipathic character of the 21-mer peptide under a helical conformation.169
- Figure 6.2:** ^{31}P static NMR spectra of DMPC (*left*) and DPPC (*right*) bicelles at different temperatures, and in the absence and presence of the 21-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.....179
- Figure 6.3:** ^2H NMR spectra of DMPC (*left*) and DPPC (*right*) bicelles at 35°C and 40°C in the absence and presence of the 21-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.182
- Figure 6.4:** ^{15}N NMR spectra of the 21-mer peptide in the (a) lyophilized state, (b) incorporated into DMPC multilamellar vesicles at 0°C , (c) incorporated into DMPC bilayers stacked between glass plates at 37°C , and (d) in DMPC bicelles at 33°C . The lipid/peptide molar ratio is 60:1.185
- Figure 6.5:** ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the [^{13}CO]Leu $_{18}$ -21-mer peptide (a) in the lyophilized state, and (b) incorporated to hydrated DMPC vesicles at 37°C and at a lipid/peptide molar ratio of 10:1. The MAS spinning speed was set to 5000 Hz. The signals marked by * and † indicate isotropic resonance chemical shifts of 175.6 ppm and 172.0 ppm, respectively.....188
- Figure 6.6:** ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the [^{13}CO]Leu $_{18}$ -21-mer peptide incorporated to hydrated DMPC vesicles at 37°C and at a lipid/peptide molar ratio of 10:1. The MAS spinning speed was set to 2500 Hz to generate the spinning sidebands. The signal marked by * indicates the isotropic resonance chemical shift of 175.6 ppm.189

Figure 6.7: Proposed model of membrane interaction for the 21-mer cytotoxic model peptide incorporated to (a) perpendicular bicelles, and (b) to oriented DMPC bilayers. In (a), the 21-mer peptide may be either located on the bicelle rim in an orientation perpendicular to the magnetic field direction, and/or undergo fast rotational diffusion around the bilayer normal in combination to complex dynamic motions. In (b), the 21-mer peptide lies at the bilayer surface in its most favorable membrane orientation, and adopts a transmembrane orientation under specific conditions of electrochemical and electric gradients.191

Figure 7.1: Schéma de l'évolution des propriétés des peptides antimicrobiens et de l'adaptation subséquente des mécanismes de résistance bactérienne: (a) Dégradation protéolytique des peptides linéaires, (b) Introduction de ponts disulfure limitant la dégradation protéolytique, (c) Transport du peptide hors de la bactérie via des transporteurs spécifiques, (d) Modification de la séquence en acides aminés et perte de reconnaissance par les transporteurs spécifiques, (e) Introduction de charges positives à la membrane bactérienne, (f) Répulsion électrostatique entre les peptides et la membrane, et (g) Augmentation du nombre de charges positives sur le peptide.....199

Liste des abréviations

<i>Abe</i>	Abequose
AMSDb	<i>Antimicrobial Sequences Database</i>
APD	<i>Antimicrobial Peptide Database</i>
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i> , réflexion totale atténuée
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbone
CA	Cécropine A
CAMP	<i>Cationic antimicrobial peptide</i> , peptide antimicrobien cationique
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i> , dichroïsme circulaire
CHAPSO	sulphate de 3-(cholamidopropyl)diméthylammonio-2-hydroxyl-1-propane
CL	Cardiolipine
CMC	Concentration micellaire critique
CP	<i>Cross-polarization</i> , polarisation croisée
CSA ou ADC	<i>Chemical shift anisotropy</i> , anisotropie de déplacement chimique
DHPC	Dihexanoylphosphatidylcholine
DiPhy	Diphytanoylglycérolphosphocholine
DLPC	Dilauréoylphosphatidylcholine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylsulfoxyde
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPE-DTPA	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine-diéthylènetriamine-pentaacétate
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycérol
DOTAP	1,2-dioléoyl-3-(triméthylammonium)propane
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DVB	Divinylbenzène
EC	Éthers en couronne
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>N,N'</i> -1,2-éthanediylbis-[<i>N</i> -(carboxyméthyl)glycine]
EFG	<i>Electric field gradient</i> , gradient de champ électrique
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ERV	<i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine
FCCP	<i>Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phenylhydrazone</i>
FID	<i>Free induction decay</i> , signal de précession libre
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfert</i> , fluorescence par transfert d'énergie de résonance
FTIR ou IR-TF	<i>Fourier transform infrared</i> , infrarouge à transformée de Fourier
FWHM, fwhm	<i>Full width at half-maximum</i> , largeur à mi-hauteur
<i>Gal</i>	Galactose
<i>Glc</i>	Glucose
<i>GlcN</i>	Glucosamine
<i>Hep</i>	Heptulose

HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , chromatographie liquide à haute performance
Hz	Hertz
J	Joule
KDO	<i>2-keto-3-deoxyoctonate</i> , 2-céto-3-désoxyoctonate
kHz	Kilohertz
KLA	Séquence modèle lysine-leucine-alanine
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPS	Lipopolysaccharide
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i> , grande vésicule unilamellaire
M	Molaire
<i>Man</i>	Mannose
MAS	<i>Magic-angle spinning</i> , rotation à l'angle magique
ME	Méllittine
Menk	Méthionine-enképhaline
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
mL	Millilitre
MLV	<i>Multilamellar vesicle</i> , vésicule multilamellaire
mM	Millimolaire
ms	Milliseconde
nm	Nanomètre
N	Newton
<i>NAG</i>	N-acétylglucosamine
NMR ou RMN	<i>Nuclear magnetic resonance</i> , résonance magnétique nucléaire
ppm	Partie par million
PA	<i>Phosphatidic acid</i> , acide phosphatique
pA	Picoampère
PAS	<i>Principal axis system</i> , système d'axes principal
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PGLa	<i>Peptide between Glycine and Leucine amide</i>
POPC	1-palmitoyl-2-oléoylphosphatidylcholine
POPE	1-palmitoyl-2-oléoylphosphatidyléthanolamine
POPG	1-palmitoyl-2-oléoylphosphatidylglycérol
POPS	1-palmitoyl-2-oléoylphosphatidylsérine
PS	Phosphatidylsérine
REDOR	<i>Rotational-echo double resonance</i>
<i>Rha</i>	L-rhamnose
SANS	<i>Small angle neutron scattering</i> , diffusion de neutrons à bas angle
SAPD	<i>Synthetic Antibiotic Peptides Database</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SLUV	<i>Short-chain/long-chain unilamellar vesicle</i> , vésicule unilamellaire de lipides à courtes et longues chaînes
SM	Sphingomyéline

SMH	Shai-Matsuzaki-Huang
ST	Cholestérol/ergostérol
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i> , petite vésicule unilamellaire
T	Tesla
TPPM	<i>Two pulse phase modulation</i>
u.a.	Unité d'absorbance
μL	Microlitre
μm	Micromètre
μM	Micromolaire
μs	Microseconde
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organisation mondiale de la santé

Chapitre 1

Introduction

1.1 Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques, considérés comme les drogues miracles du 20^{ème} siècle, sont largement utilisés pour traiter et prévenir de nombreuses infections causées par les bactéries (1). Leur efficacité a été démontrée contre des bactéries puissantes telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, et *Streptococcus pneumoniae* causant des infections multiples telles que les infections de la peau, les infections post-chirurgicales, les infections pulmonaires et les méningites d'origine bactérienne (1). Toutefois, un emploi irrationnel et abusif des antibiotiques a mené à l'émergence de souches bactériennes résistantes et ce, dès leurs premières utilisations (1-4). Phénomène initialement local, la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un problème d'envergure mondiale qui préoccupe l'Organisation mondiale de la santé (WHO) (5, 6). Cette préoccupation est d'autant plus présente depuis l'apparition des souches résistantes SARM (*S. aureus* résistant à la méthicilline) et ERV (*Enterococcus* résistant à la vancomycine) pour lesquelles les moyens actuels de combattre les infections sont très limités (7).

La résistance des bactéries aux antibiotiques se manifeste via cinq mécanismes principaux: (a) l'altération ou le remplacement de la cible visée par l'antibiotique, (b) la modification de la perméabilité de la membrane bactérienne, (c) le transport actif de l'antibiotique hors de la bactérie via l'activation de pompes à efflux, (d) le développement de voies métaboliques auxiliaires, et (e) la dégradation et/ou la modification chimique de l'antibiotique résultant en son inactivation (2). Tous ces mécanismes de résistance ont amené la communauté scientifique à développer de nouvelles stratégies pour combattre la

résistance bactérienne. Parallèlement à l'identification de nouvelles cibles potentielles via l'étude du métabolisme bactérien, le développement de classes de composés de nature peptidique possédant des mécanismes d'action inédits est depuis quelques années exploité par de nombreux groupes de recherche (8).

1.2 Peptides antimicrobiens à activité membranaire

Depuis près de 40 ans, aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'a été introduite sur le marché, les nouveaux composés mis au point étant des analogues d'antibiotiques déjà existants (8). Devant l'ampleur du problème de la résistance bactérienne, plusieurs groupes de recherche se sont tournés vers l'étude des peptides antimicrobiens comme alternative potentielle aux antibiotiques devenus inefficaces. Longtemps reconnus comme antibiotiques naturels faisant partie intégrante du système de défense d'une multitude d'organismes vivants, les peptides antimicrobiens possèdent des activités très intéressantes envers de nombreux agents pathogènes, de même que des activités de modulation de la réponse immunitaire (9-14). Dans les sections suivantes, nous verrons en détail les caractéristiques structurales et fonctionnelles qui rendent compte du potentiel thérapeutique des peptides antimicrobiens d'origine naturelle et synthétique comme alternative aux antibiotiques.

1.2.1 Caractéristiques des peptides antimicrobiens naturels

Les peptides antimicrobiens se retrouvent chez des êtres vivants aussi diversifiés que les bactéries, les virus, les champignons, les plantes et les animaux (15, 16). Malgré l'étonnante diversité de leur séquence en acides aminés, ces peptides présentent plusieurs caractéristiques communes qui semblent essentielles à l'activité antimicrobienne (17-19). Les peptides antimicrobiens sont relativement petits et comprennent entre 10 et 50 acides aminés. La présence de résidus d'acides aminés arginine et lysine chargés positivement confère aux peptides antimicrobiens un caractère cationique variant généralement entre +2

et +9. Ils sont également pourvus de résidus hydrophobes dans des proportions supérieures ou égales à 50 %. Sous leur conformation tridimensionnelle, les peptides antimicrobiens adoptent une structure amphiphile caractérisée par la ségrégation spatiale des régions polaires et hydrophobes. Les caractères cationique et amphiphile des peptides antimicrobiens seraient en grande partie responsables de leur activité antimicrobienne (20). La Figure 1.1 illustre la structure amphiphile adoptée par le peptide antimicrobien non naturel CA(1-8)-ME(1-18). Ce peptide, issu de l'hybridation des régions N-terminales des peptides cécropine A et mélittine pour les résidus 1-8 et 1-18, possède des propriétés antimicrobiennes à la fois sur les bactéries Gram positive et négative (21, 22).

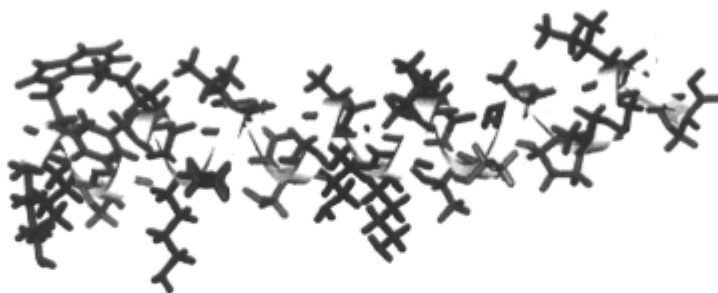


Figure 1.1: Représentation graphique du peptide antimicrobien hybride CA(1-8)-ME(1-18) (19). Les chaînes latérales des résidus lysine et autres résidus hydrophiles sont illustrées en rouge et en brun, et les chaînes latérales des résidus hydrophobes sont représentées en vert.

Les peptides antimicrobiens peuvent se regrouper sous cinq grandes classes basées à la fois sur leur structure et leur composition. Dans ces classes, nous retrouvons: (a) les peptides hélicoïdaux, (b) les peptides en feuillets β , (c) les peptides comportant des résidus cystéine formant des ponts disulfure, (d) les peptides riches en acides aminés spécifiques tels que les résidus tryptophane, proline, glycine et histidine, et (e) les peptides comportant des acides aminés modifiés tels que les résidus lanthionine, déhydroalanine, acide α -aminobutyrique, et les énantiomères D d'acides aminés naturels (23-25). Indépendamment de la nature de la classe structurale, les peptides antimicrobiens présentent tous un caractère

amphiphile plus ou moins important. Un exemple de peptide antimicrobien associé à chaque classe structurale est donné au tableau 1.1.

Tableau 1.1: Exemples de peptides antimicrobiens associés aux cinq classes structurales.

Classes structurales	Peptides antimicrobiens	Séquence	Origine
Linéaires hélicoïdaux	Magainine 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Amphibiens
Feuillets β	Lactoferricine B	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF	Lait bovin
Acide aminé cystéine	Protégrine 1	RGGRLCYCRRRFCVCVGRa	Leucocyte porcine
Acides aminés spécifiques	Indolicidine	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	Neutrophile bovin
Acides aminés modifiés	Alaméthicine ^a	Ac-XPXAXAQVXGLXPVXXEEJ	Champignons

a) Acides aminés non naturels pour l'alaméthicine: X (acide α -aminoisobutyrique), J (L-phénylalaninol)

Les peptides antimicrobiens présentent plusieurs avantages sur les antibiotiques communément employés (17, 18, 26-28). En effet, ils possèdent un spectre d'activité largement étendu, présentant des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires et anticancéreuses. Bien que la grande majorité des études sur les peptides antimicrobiens portent sur leur activité antibactérienne, le terme « antimicrobien » est généralement employé dans la littérature puisqu'il tient compte de ce large domaine d'activité. Les peptides antimicrobiens sont également reconnus pour induire très peu de résistance chez les agents pathogènes compte tenu de leur rapidité d'action à neutraliser ceux-ci. Un aspect important à considérer dans le développement d'agents antimicrobiens de nature peptidique est leur synergie potentielle avec certains antibiotiques. Ce phénomène a d'ailleurs été observé pour le couple de peptide antimicrobien et d'antibiotique alaméthicine/endorfloxacin (28). Finalement, leur action sur les bactéries amène très souvent la libération d'endotoxines telles que les lipopolysaccharides (LPS) dont ils sont en mesure de minimiser les effets néfastes sur les cellules hôtes.

1.2.2 Sélectivité des peptides antimicrobiens

La très grande majorité des peptides antimicrobiens présentent une sélectivité pour les bactéries Gram négative et Gram positive au détriment des cellules eucaryotes (25, 29).

À titre d'exemple, les peptides magainine et dermaseptine sont actifs à la fois chez les bactéries Gram négative et positive (30, 31), alors que les peptides de la famille des cécropines sont surtout actifs sur les bactéries Gram négative (32). Cette sélectivité des peptides antimicrobiens cationiques pour les bactéries s'expliquerait par la nature anionique des enveloppes des bactéries Gram négative et positive, où les interactions électrostatiques jouent un rôle dans l'attraction initiale des peptides à la surface des bactéries (33). La Figure 1.2 illustre les enveloppes respectives des bactéries Gram négative et Gram positive.

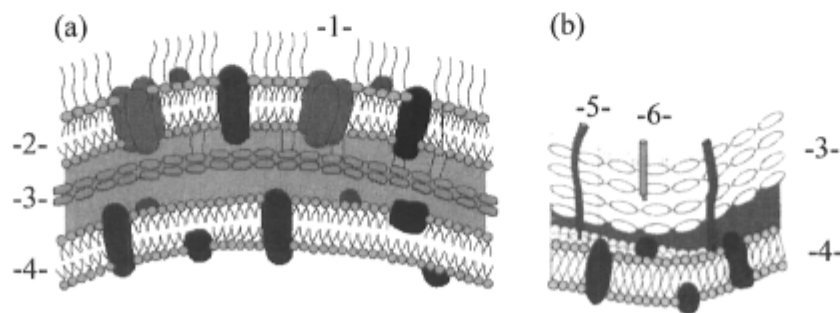


Figure 1.2: Schémas des enveloppes de bactéries (a) Gram négative et (b) Gram positive, ayant les composantes suivantes: -1- Lipopolysaccharides (LPS), -2- Membrane externe, -3- Paroi de peptidoglycan, -4- Membrane cytoplasmique, -5- Acide lipotéichoïque, et -6- Acide téichoïque (34).

Tel qu'illustré à la Figure 1.2, les enveloppes des bactéries Gram négative et positive sont composées de molécules chargées négativement, telles que les molécules de lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négative, et les acides lipotéichoïques et téichoïques associés à la paroi de peptidoglycan chez les bactéries Gram positive. Les structures respectives de ces molécules sont représentées à la Figure 1.3 ci-dessous.

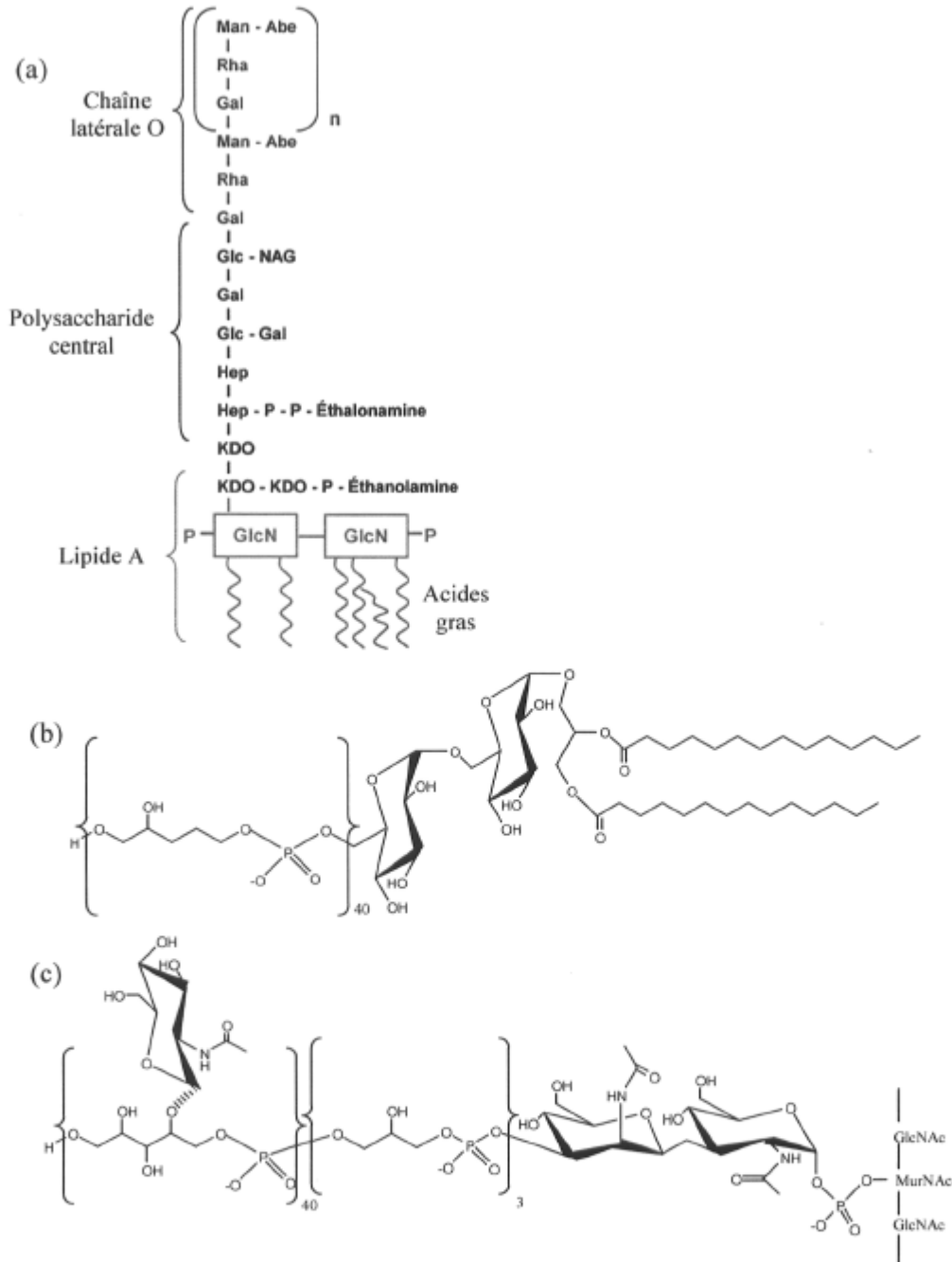


Figure 1.3: (a) Structure de la couche de LPS (35). *Abe*: abequeose, *Gal*: galactose, *Glc*: glucose, *GlcN*: glucosamine, *Hep*: heptulose, *KDO*: 2-céto-3-désoxyoctonate, *Man*: mannose, *NAG*: N-acétylglucosamine, *P*: phosphate, *Rha*: L-rhamnose. Structures des acides (b) lipotéichoïques et (c) téichoïques associés à la paroi de peptidoglycan chez les bactéries Gram positive (36).

Les molécules de LPS sont constituées de trois unités: la chaîne latérale O variable d'une bactérie à l'autre, l'unité polysaccharide centrale et le lipide A qui agit à titre d'endotoxine. De plus, la présence de cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} aide à la stabilisation de la membrane externe des bactéries Gram négative en minimisant les répulsions électrostatiques entre les unités anioniques LPS. Les acides lipotéichoïques et téichoïques propres aux bactéries Gram positive aident quant à eux au maintien et à l'intégrité structurale de la paroi de peptidoglycan.

Les études structurales et fonctionnelles réalisées sur les peptides antimicrobiens naturels révèlent que la membrane cytoplasmique, de nature anionique et commune aux bactéries Gram négative et positive, semble être la cible principale (20, 25). Il a cependant été observé que certains peptides présentent des cibles intracellulaires, tel que le peptide antimicrobien d'origine humaine défensine-1 reconnu pour inhiber la synthèse d'ADN et de protéines chez la bactérie Gram positive *S. aureus* (37, 38). Pour atteindre et agir sur ces cibles, les peptides doivent toutefois traverser la membrane externe des bactéries Gram négative et la paroi de peptidoglycan à la fois chez les bactéries Gram négative et positive (23, 37, 39). Bien que les interactions entre les peptides antimicrobiens, la membrane externe et la paroi de peptidoglycan soient mal comprises, des études ont révélé que plusieurs peptides tels que la magainine, les hybrides CA-ME et la mélittine ont une affinité pour la couche de LPS des bactéries Gram négative (22, 40-42). Plus spécifiquement, les peptides antimicrobiens interagiraient de manière compétitive avec les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} pour les sites de liaison de la couche de LPS, les déplaçant et affaiblissant ainsi la membrane externe (33, 40). Cette perturbation de la membrane externe induite par l'adsorption de peptides permet à d'autres peptides, voir des antibiotiques, d'outrepasser la couche de LPS et ainsi d'atteindre la membrane cytoplasmique. Proposé par Hancock, ce mécanisme porte le nom de « self-promoted uptake pathway » (16, 43). Un aspect intéressant des interactions peptides/membranes est leur non-spécificité, c'est-à-dire que l'activité des peptides antimicrobiens ne fait pas intervenir des récepteurs membranaires particuliers (44). Ce fait a été démontré par la rétention de l'activité antimicrobienne pour

les analogues diastéréomères D de peptides antimicrobiens naturels tel que la mélittine et la magainine (44, 45).

Certains peptides, en plus de leur activité antimicrobienne, démontrent une activité hémolytique importante (46). La cytotoxicité a été observée chez les peptides antimicrobiens tels que la mélittine, la δ -hémolysine et l'alaméthicine (46, 47). Dans la grande majorité des cas, la concentration à laquelle l'activité antimicrobienne se manifeste est de l'ordre du μM , ce qui est inférieur à la concentration à laquelle l'activité hémolytique a lieu et qui est de l'ordre de la centaine de μM , voir plus (48-50). À titre d'exemple, le peptide magainine d'origine amphibienne possède une activité antimicrobienne dans un domaine de concentration allant de 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, alors que son activité hémolytique n'est observée qu'à des concentrations supérieures à 1 mg/mL (51, 52).

Compte tenu de la nature cationique des peptides antimicrobiens, et du fait que certains peptides démontrent une activité cytotoxique sur les cellules eucaryotes, il est proposé que, parallèlement aux interactions de nature électrostatique, les interactions hydrophobes jouent un rôle important dans l'activité membranaire de ces peptides (18, 53). Dans les sections qui vont suivre, nous décrirons en détail chacun des mécanismes de perturbation membranaire proposés dans la littérature, et des exemples de peptides antimicrobiens seront donnés pour chacun des mécanismes d'action. Bien que ces mécanismes soient couramment employés dans la description du mode d'action de peptides antimicrobiens, ceux-ci demeurent des mécanismes de perturbation membranaire généraux servant de modèles aussi bien aux études d'activité antimicrobienne qu'aux études d'activité cytotoxique. Nous verrons également qu'il est possible de moduler l'activité membranaire des peptides en modifiant certains de leurs paramètres structuraux. Nous constaterons, au travers d'exemples, que les études de modulation permettant l'identification des facteurs prépondérants dans les activités antimicrobienne et cytotoxique ont ouvert la voie au design et au développement de peptides synthétiques possédant des activités membranaires s'apparentant à celles des peptides antimicrobiens naturels.

1.3 Mécanismes de perturbation membranaire

Les études réalisées sur les peptides antimicrobiens démontrent que ceux-ci possèdent une activité membranaire importante, et cette activité serait responsable de leur action antimicrobienne, de même que de l'action cytotoxique observée chez certains peptides. Cependant, les interactions impliquées dans les mécanismes de perturbation membranaire des peptides antimicrobiens sont encore mal comprises. Comme une meilleure compréhension de ces mécanismes est essentielle au développement de nouveaux agents antimicrobiens possédant des mécanismes d'action inédits, plusieurs groupes de recherche concentrent leurs efforts sur l'étude des interactions lipides/peptides.

Les modèles d'interaction membranaire les plus communs sont proposés par Shai, Matsuzaki et Huang comme étant les modèles SMH (29, 54, 55). Pour exercer leur activité membranaire, les peptides antimicrobiens doivent dans un premier temps s'adsorber à la surface de la membrane lipidique. Cette adsorption est très souvent accompagnée d'un changement de structure chez le peptide, passant d'une conformation aléatoire à une structure ordonnée amphiphile. À faible concentration, les peptides demeurent adsorbés à la surface dans une orientation parallèle au plan de la bicouche. À plus forte concentration toutefois, ils désintègrent la membrane via la formation de micelles, ou ils perturbent l'intégrité de la membrane par la formation de pores. Ces pores, d'une durée de vie variable, perturbent l'équilibre électrochimique de la cellule. Les forces motrices d'adsorption et de liaison des peptides sur les bicouches lipidiques sont de nature électrostatique, hydrophobe et de liaisons hydrogène (53). Bien entendu, ces mécanismes de perturbation membranaire dépendent de plusieurs facteurs tels que la composition et l'état physique de la membrane lipidique, la morphologie des lipides et la nature et la structure des peptides antimicrobiens (56). De plus, il est important de préciser que les mécanismes de perturbation membranaire ne sont pas exclusifs et qu'un mécanisme donné peut être l'intermédiaire d'un mécanisme subséquent (39).

1.3.1 Désintégration de la membrane lipidique (57)

Le premier mécanisme d'action proposé pour les peptides antimicrobiens est le modèle « carpet-like ». Dans ce modèle, les peptides s'adsorbent initialement à la surface de la bicouche et forment un tapis peptidique dense. Au-delà d'une certaine concentration critique, il y a la désintégration de la membrane lipidique sous forme de petites structures micellaires. Ce modèle d'interaction membranaire a été observé pour les peptides antimicrobiens cécropine (58-60), dermaseptine (61), ovispirine (62) et mélistine (45, 63, 64) à haute concentration. Le modèle « carpet-like » est illustré à la Figure 1.4 ci-contre.



Figure 1.4: Modèle de désintégration membranaire « carpet-like » (39).

Les peptides agissant selon ce modèle demeurent en contact avec les têtes polaires des phospholipides tout au long du processus de désintégration membranaire. La présence de lipides chargés négativement est un facteur important pour la formation du tapis de peptides. En effet, ces lipides anioniques favorisent à la fois l'attraction et la concentration des peptides cationiques à la surface de la bicouche tout en stabilisant les répulsions électrostatiques entre les résidus d'acides aminés cationiques (65).

1.3.2 Formation de pores membranaires (39)

Le deuxième type de perturbation membranaire proposé pour les peptides antimicrobiens fait intervenir la formation de pores membranaires. Les peptides exerçant leur activité antimicrobienne via la formation de pores perturbent les potentiels transmembranaires et les gradients ioniques, donnant lieu au relargage de composantes cellulaires vitales et à la mort de la cellule. Comme le nombre de pores nécessaire au déséquilibre cellulaire est relativement bas, l'activité antimicrobienne des peptides agissant selon ce modèle est observée à des concentrations largement inférieures à celles observées pour le modèle « carpet-like », et est de l'ordre du micromolaire (29). Les deux modèles de formation de pores membranaires présentés dans cette section sont les modèles « barrel-stave » et « toroïdal ». Le point commun des deux modèles est l'adsorption initiale des peptides à la surface des bicouches lipidiques et ce, à faible concentration. Au fur et à mesure que la concentration peptidique augmente, il y a la formation de pores d'architecture différente, et cet aspect structural distingue les pores « barrel-stave » des pores « toroïdal ». Indépendamment du modèle, les pores membranaires présenteront des tailles diverses, ainsi que des stabilités et durées de vie variables.

1.3.2.1 Modèle « barrel-stave » (29, 39)

Le premier modèle de pore membranaire est le modèle « barrel-stave » illustré à la Figure 1.5. Ce modèle est fréquemment utilisé pour expliquer la formation des pores et les augmentations de conductivité « en marche » régulières et reproductibles observées dans les expériences de conductivité monomoléculaire (57). Les peptides agissant selon le modèle « barrel-stave » doivent répondre à des critères particuliers (29): (a) ils doivent être suffisamment hydrophobes pour pénétrer dans le cœur de la bicouche, (b) ils doivent s'auto-assembler pour former le pore, et la taille du pore dépend du nombre de monomères peptidiques impliqués, et (c) ils doivent avoir une longueur suffisante pour traverser la bicouche lipidique sans qu'il n'y ait incompatibilité hydrophobe (66).

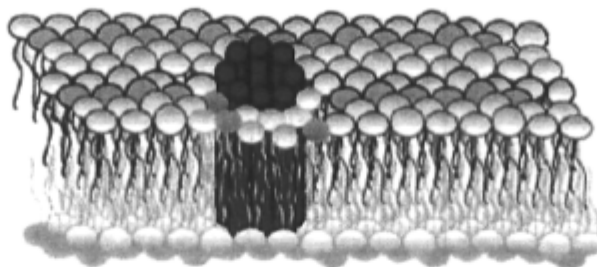


Figure 1.5: Mécanisme de formation de pores membranaires « barrel-stave » (39).

Le pore « barrel-stave » est formé par des peptides amphiphiles dont la région hydrophobe fait face aux chaînes acyle des lipides, alors que la région hydrophile compose l'intérieur du pore proprement dit. Compte tenu du fait que le pore est formé de la juxtaposition d'unités peptidiques, il est majoritairement observé pour des peptides zwitterioniques ou très peu chargés où la répulsion électrostatique est minimale (67). Le peptide antimicrobien alaméthicine est le peptide le plus étudié dans la compréhension de ce mécanisme d'action. Des études de diffraction des neutrons ont révélé que, sous certaines conditions de concentration et de composition lipidiques, les pores créés par le peptide alaméthicine résultent de l'auto-assemblage de huit monomères, et les diamètres externe et interne des pores sont d'environ 40 Å et 18 Å (68).

1.3.2.2 Modèle « toroïdal » (39, 56)

Le deuxième mécanisme de pore membranaire est le modèle « toroïdal » illustré à la Figure 1.6. Ce modèle est couramment employé pour expliquer le mode de perturbation membranaire de peptides de longueur insuffisante pour accommoder une orientation transmembranaire telle qu'observée dans le modèle « barrel-stave » (39).

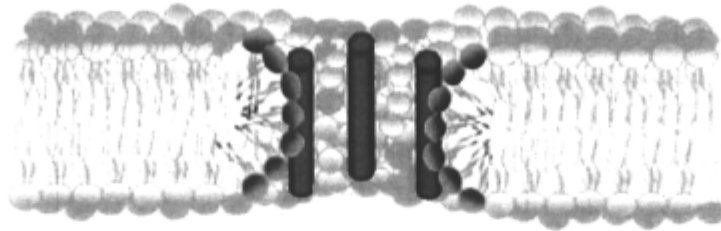


Figure 1.6: Mécanisme de formation de pores membranaires « toroïdal » (39).

Dans le modèle « toroïdal », le pore membranaire est formé à la fois des parties hydrophiles des peptides et des têtes polaires des lipides, la région hydrophobe des peptides faisant face aux chaînes acyle des lipides. Cet arrangement où les têtes polaires des lipides s'intercalent entre les monomères peptidiques cationiques en minimise les répulsions électrostatiques. La formation des pores toroïdaux se produit lorsque les peptides, adsorbés à la surface, induisent une contrainte de courbure positive à la bicouche. Cette contrainte de courbure amène les lipides adjacents aux peptides à changer d'orientation par rapport au plan de la bicouche lipidique. La connexion des monocouches lipidiques externe et interne résultant de la contrainte de courbure permet la translocation des lipides et des peptides de part et d'autre des monocouches de lipides (23, 69, 70). Le peptide d'origine amphibienne magainine 2 est l'un des fidèles représentants du modèle « toroïdal » (71, 72). Des études de diffusion des neutrons réalisées par le groupe de Huang ont démontré que les pores toroïdaux formés par la magainine 2 sont constitués de quatre à sept monomères et ont un diamètre d'environ 30 Å (54, 73). Le modèle « toroïdal » de pores membranaires est également reconnu comme mécanisme intermédiaire du modèle « carpet-like » pour les peptides tels que la mélittine à des concentrations inférieures à la concentration critique de formation des micelles, appelée concentration micellaire critique (CMC) (74).

1.4 Peptides synthétiques à activité membranaire

Dans les sections précédentes, nous avons vu que les peptides antimicrobiens, peuvent à la fois présenter des activités antimicrobiennes et cytotoxiques, et qu'ils

partagent plusieurs caractéristiques communes. Malgré tous les modèles d'interaction membranaire proposés dans la littérature, il y a encore beaucoup d'interrogation quant aux interactions impliquées dans ces mécanismes ainsi que sur les paramètres structuraux qui sont susceptibles de moduler ces interactions. Devant la faible homologie de séquence des peptides antimicrobiens, il devient très difficile de prédire leur activité biologique par la simple analyse de leur séquence d'acides aminés (16). Plusieurs groupes de recherche se tournent donc vers la synthèse peptidique de composés modèles afin de mieux définir et comprendre les règles qui dictent les activités antimicrobienne et cytotoxique. En effet, la synthèse peptidique permet d'avoir un contrôle des divers paramètres structuraux susceptibles de moduler l'activité des peptides antimicrobiens. Ainsi, une meilleure compréhension de ces paramètres ouvrira la voie au design et à la synthèse d'agents antimicrobiens efficaces et présentant les activités biologiques désirées (75).

1.4.1 Paramètres structuraux (56, 76, 77)

La classe structurale la plus abondante et la plus étudiée est constituée des peptides antimicrobiens hélicoïdaux. Ces peptides de nature hélicoïdale sont définis par plusieurs paramètres structuraux tels que: (a) la charge, (b) le caractère hélicoïdal, (c) l'hydrophobicité, (d) le caractère amphiphile, et (e) l'angle polaire. À l'aide d'exemples concrets tirés de la littérature, nous verrons l'impact de la modification de ces paramètres structuraux sur les activités antimicrobienne et cytotoxique des peptides à activité membranaire. Il est toutefois important de mentionner que le contrôle absolu dans la variation des paramètres structuraux est à toute fin impossible, mais que cette approche demeure un outil viable dans l'étude des activités biologiques modulées par ces paramètres.

Le premier paramètre structural influençant l'activité biologique des peptides à activité membranaire est la charge. Comme les peptides antimicrobiens sont majoritairement cationiques et que les membranes microbiennes sont anioniques, ce sont surtout les interactions électrostatiques qui dominent dans les premières étapes du processus de perturbation membranaire. La charge nette positive des peptides serait en

partie responsable de la sélectivité envers les cellules procaryotes. Il n'y a toutefois pas de corrélation directe entre la charge et l'activité antimicrobienne puisque qu'il semble exister un nombre de charge optimal pour l'activité antimicrobienne (78). Ce point a été soulevé par Matsuzaki et coll. lors d'études réalisées sur des analogues du peptide magainine 2 chargés de 0 à +6 (79). Les résultats de l'étude ont démontré qu'une augmentation de la charge favorise la liaison aux membranes anioniques et ainsi augmente l'activité antimicrobienne. Toutefois, ils ont observé que les peptides de charge supérieure à +4 forment des pores très instables dont la durée de vie est très courte, et ceci a pour effet de diminuer l'efficacité de la perturbation membranaire. De plus, les études réalisées sur des analogues cycliques des peptides mélittine et magainine par le groupe de Shai révèlent que l'analogue cyclique de la mélittine, où la charge positive est concentrée sur une petite section du cycle, présente une augmentation de l'activité antimicrobienne et une diminution de l'activité hémolytique (80). L'analogue cyclique de la magainine où la charge est répartie plus uniformément sur le cycle a des activités antimicrobienne et hémolytique moindres. Les auteurs expliquent cette diminution d'activité par une diminution du caractère hélicoïdal du peptide et par une plus forte liaison du peptide avec les constituants anioniques de la membrane externe, liaison résultant en une moins forte aptitude du peptide à atteindre la membrane cytoplasmique.

Pour démontrer l'effet du caractère hélicoïdal des peptides sur leur activité biologique, le groupe de Shai a réalisé des études sur les peptides diastéréoisomères de la mélittine et de la pardaxine (45, 81). Leurs résultats démontrent qu'une diminution du caractère hélicoïdal par l'introduction d'acides aminés D dans la séquence primaire perturbe de manière importante la structure en hélice, et cette perturbation résulte en une perte de l'activité hémolytique alors que l'activité antimicrobienne est conservée. Le caractère hélicoïdal semble donc influencer davantage l'activité des peptides sur les membranes neutres que sur les membranes anioniques.

Le troisième paramètre structural d'importance est l'hydrophobicité. L'hydrophobicité se définit comme le pourcentage en résidus d'acides aminés hydrophobes dans la séquence primaire du peptide. La grande majorité des peptides antimicrobiens

présentent un pourcentage minimal de 50 %. Ce paramètre confère au peptide son affinité pour les bicouches lipidiques. Des études réalisées sur les peptides dermaseptine, PGLa, magainine et le modèle KLA ont révélé qu'une augmentation de l'activité hémolytique était corrélée à une augmentation de l'hydrophobicité (82-85). Cependant, une hydrophobicité trop élevée résulte en une agrégation et une précipitation des peptides monomères, alors qu'une hydrophobicité trop faible nuit considérablement à l'affinité du peptide pour la bicouche (76). En somme, l'hydrophobicité, tout comme le caractère hélicoïdal, a un effet plus marqué sur l'activité hémolytique que sur l'activité antimicrobienne.

Le quatrième paramètre, considéré comme le facteur ayant la plus forte influence sur l'activité antimicrobienne, est le caractère amphiphile (ou moment hydrophobe) des peptides. Tel que vu à la section 1.2.1, le caractère amphiphile provient de la ségrégation spatiale des régions hydrophobes et hydrophiles des peptides sous leur conformation tridimensionnelle. La corrélation entre le moment hydrophobe et l'activité membranaire s'explique par la grande affinité du peptide pour la bicouche lipidique amphiphile où les interactions électrostatiques et hydrophobes stabilisent le complexe lipide/peptide (77). Des études réalisées sur un analogue du peptide mélittine dont la région C-terminale a été modifiée de manière à diminuer son moment hydrophobe ont démontré que ce peptide modèle possède une activité antibactérienne cinq fois moins importante que son parent naturel (86). L'effet a toutefois été plus drastique sur l'activité hémolytique, où l'analogue est 300 fois moins actif que la mélittine. Les résultats obtenus par Dathe et coll. sur des analogues du peptide magainine 2 confirment également qu'une augmentation du moment hydrophobe résulte en une perte de sélectivité envers les pathogènes et en une activité hémolytique plus importante (87).

Le cinquième paramètre structural à considérer dans la modulation d'activité des peptides à activité membranaire est l'angle polaire. L'angle polaire est défini comme étant la proportion ou l'espace occupé par la région polaire du peptide en conformation hélicoïdale (56). Ce paramètre tient son importance au fait que la liaison du peptide à la membrane requiert la pénétration de la région hydrophobe du peptide dans le cœur de la bicouche alors que la région hydrophile demeure en contact avec les têtes polaires et le

milieu aqueux environnant (77). Des études réalisées sur des peptides analogues à la magainine dont l'angle polaire varie de 80° à 180° démontrent que l'effet de l'angle polaire sur les activités antimicrobienne et hémolytique dépend de la composition des membranes (88). En effet, la liaison du peptide à la bicouche augmente pour les analogues dont l'angle polaire est grand (140°-180°) et pour les membranes chargées négativement, alors que l'efficacité de perméabilisation est plus importante pour les analogues avec un angle polaire de 80°-120° et pour des membranes faiblement anioniques. Les conclusions tirées des études de Uematsu et coll. sur des peptides modèles composés majoritairement des résidus alanine et lysine dont les angles polaires sont de 100° et 180° sont en accord avec les constats des études sur les analogues de magainine (89). Ces résultats affirment que les peptides d'angle polaire de 100° ont une plus grande efficacité de perméabilisation contrairement aux peptides d'angle polaire de 180°. Ainsi, la valeur de l'angle polaire a une influence sur le mode de perturbation membranaire, à savoir la formation et la stabilité des pores et l'induction de contraintes de courbure positive ou négative à la bicouche.

1.4.2 Peptides amphiphiles modèles 14- et 21-mères

Dans ce projet, nous nous intéressons à l'étude des mécanismes de perturbation membranaire de deux peptides synthétiques mis au point dans le laboratoire du professeur N. Voyer. Ces peptides résultent de la dimérisation et de la trimérisation d'une unité heptamère composée d'une alternance de résidus leucine et phénylalanine modifiée par l'addition d'éthers en couronne pour former respectivement des peptides de 14 et 21 acides aminés. Ces peptides sont obtenus par synthèse sur support solide en utilisant le groupement protecteur Butyloxycarbonyle (Boc) sur billes de polystyrène fonctionnalisées par des fonctions oxime. La structure commune des peptides est représentée à la Figure 1.7 ci-contre.

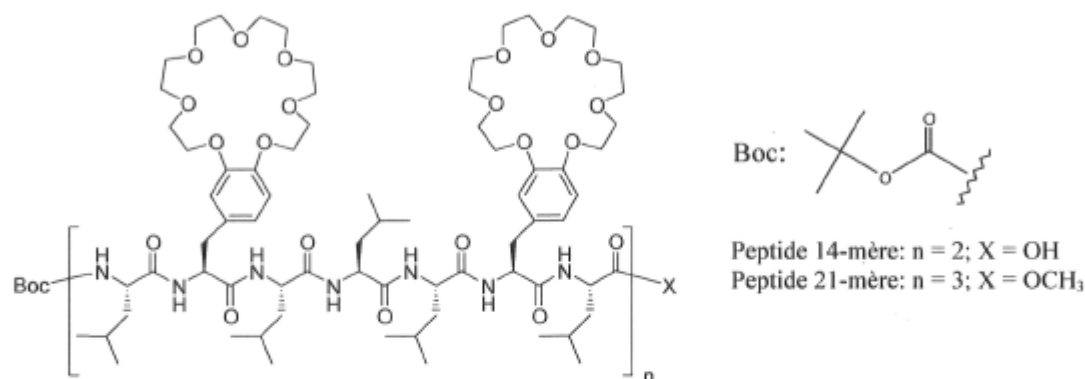


Figure 1.7: Structure commune des peptides 14- et 21-mères, et du groupement Boc. Le peptide 14-mère ($n = 2$) comporte un groupement OH en C-terminal et un groupement Boc en N-terminal. Le peptide 21-mère ($n = 3$) comporte un groupement OCH_3 en C-terminal et un groupement Boc en N-terminal.

Il est important de mentionner ici que les peptides 14- et 21-mères ont été développés dans le laboratoire du professeur N. Voyer lors de projets antérieurs. Dans cette section, nous tenons à faire ressortir les conclusions générales de ces projets qui ont motivé les études biophysiques en spectroscopies de RMN et IR-TF présentées dans cette thèse. Nous relaterons donc les études précédentes réalisées sur ces peptides en insistant plus particulièrement sur leur design rationnel et leur activité membranaire plutôt que sur leur synthèse. Les étapes de synthèse ont déjà fait l'objet de publications et sont également rapportées par Éric Biron dans son mémoire de maîtrise et sa thèse de doctorat (90-93).

1.4.2.1 Historique des peptides 14- et 21-mères

Le design rationnel des peptides 14- et 21-mères s'inspire des caractéristiques des peptides naturels possédant une activité membranaire, c'est-à-dire qu'il vise à produire des structures possédant un caractère hélicoïdal et une nature amphiphile. Les résidus leucine et phénylalanine ont été choisis en raison de leur propension à former des structures hélicoïdales (94). La conformation en hélice α des peptides modèles a été confirmée par

des études en spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (90, 91, 93). La Figure 1.8 illustre les projections en roues hélicoïdales des peptides 14- et 21-mères.

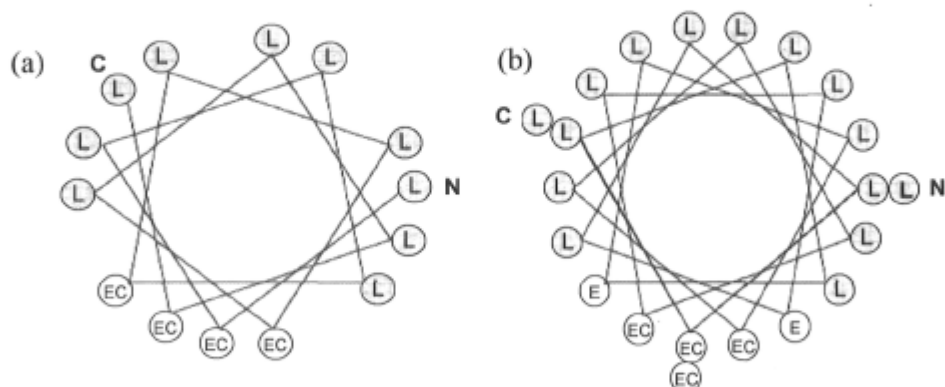


Figure 1.8: Projections en roues hélicoïdales des peptides (a) 14-mère et (b) 21-mère. Les résidus leucine hydrophobes (L) et phénylalanine portant les éthers en couronne (EC) sont représentés par les régions grises et blanches. Les positions indiquées par N et C sont les régions N- et C-terminales respectives.

Comme nous pouvons le constater sur les représentations en roues hélicoïdales des peptides 14- et 21-mères, les résidus phénylalanine portant les éthers en couronne ont été stratégiquement positionnés aux endroits (2, 6, 9, 13) et (2, 6, 9, 13, 16, 20) dans les séquences primaires des peptides 14- et 21-mères de manière à favoriser leur rapprochement sous une conformation hélicoïdale. Cette ségrégation spatiale des résidus hydrophobes leucine et des résidus polaires phénylalanine portant les éthers en couronne confère aux peptides un caractère amphiphile reconnu pour maximiser les interactions avec les membranes lipidiques (53, 56). Les éthers en couronne 21-7, macrocycles de 21 atomes dont 7 atomes d'oxygène, ont été choisis comme constituants de la région polaire des peptides compte tenu de leur faible complexation avec les ions des métaux alcalins (95, 96). De plus, la facilité avec laquelle la taille des éthers en couronne peut être réduite permet de modifier le caractère amphiphile des peptides (92). Outre la nature chimique de la terminaison en C-terminal, les peptides 14- et 21-mères se distinguent par leur longueur. Assumant que ceux-ci adoptent une structure en hélice α parfaite de 3,6 résidus par tour et un pas d'hélice de 1,5 Å (94), les peptides 14- et 21-mères ont respectivement des longueurs de 21,0 Å et 31,5 Å.

Les études antérieures portant sur l'activité membranaire *in vitro* des peptides 14- et 21-mères ont démontré que ceux-ci sont de bons perturbateurs membranaires et que cette propriété peut être exploitée pour le design d'agents antimicrobiens synthétiques potentiels. Vandenburg et coll. ont mené des études en spectroscopie de fluorescence pour déterminer la capacité des peptides 14- et 21-mères à induire le relargage de molécules fluorescentes de calcéine encapsulées dans des vésicules unilamellaires de phosphatidylcholine (97). Les résultats de l'étude ont démontré que le peptide 14-mère induit une fuite importante de la calcéine d'environ 60 %, alors que la fuite induite par le peptide 21-mère n'est que d'environ 10 %. Parallèlement aux études de fluorescence, des expériences en spectroscopie de RMN du sodium-23 réalisées par Otis et coll. ont révélé que les peptides 14- et 21-mères induisent la fuite d'ions sodium de vésicules lipidiques (98). L'activité de transporteur membranaire du peptide 21-mère a également été étudiée par les techniques de pH-stat et de conductivité monomoléculaire par Biron et coll., et Meillon et coll. (90, 99-101). Ces techniques mesurent de manière quantitative les activités de transporteur membranaire de peptides de type « canal ionique » pour diverses espèces ioniques. Les résultats obtenus pour le peptide 21-mère ont démontré une activité de canal ionique pour les espèces ioniques Cs^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ et Rb^+ . L'ensemble des techniques employées à l'étude des activités membranaires des peptides 14- et 21-mères est présenté au chapitre 3.

Des expériences préliminaires *in vivo* ont également été réalisées pour déterminer les activités antimicrobienne et cytotoxique des peptides 14- et 21-mères (90, 93, 97). Les études *in vitro* ayant démontré une activité membranaire maximale pour les peptides 14- et 21-mères possédant respectivement une fonction acide et estérifiée en C-terminal (voir Figure 1.7), ces peptides ont été utilisés aux fins des tests biologiques. En utilisant la technique de dilution par bouillon (35), les bactéries Gram négative *Escherichia coli* ont été soumises à des concentrations en peptide de 10, 1, 0,1 et 0,01 μM et aucune inhibition de croissance n'a été observée. L'activité hémolytique a quant à elle été investiguée sur des érythrocytes par spectrophotométrie dans le domaine du visible pour différentes concentrations en peptide (102). Les peptides 14- et 21-mères induisent tous deux une fuite d'hémoglobine de 90%. Le peptide 14-mère possède toutefois un seuil de concentration minimale de 4 μM alors que le peptide 21-mère, pour un même pourcentage de relargage,

affiche une concentration minimale de 8 μ M. En dernier lieu, l'activité cytotoxique du peptide 21-mère a été démontrée sur des cellules cancéreuses de type MDA (cancer du sein) et P388 (cellules leucémiques de souris) (90). À la lumière des résultats obtenus des études précédentes, il semble que les peptides 14- et 21-mères interagissent différemment avec les membranes lipidiques. En effet, le peptide 14-mère perturbe de manière significative l'intégrité des membranes, alors que le peptide 21-mère présente des activités de canal ionique lorsqu'incorporé dans les bicouches lipidiques.

Comme les peptides 14- et 21-mères présentent des activités *in vitro* et *in vivo* similaires à celles des peptides antimicrobiens naturels, nous nous sommes intéressés à la compréhension des interactions impliquées dans les mécanismes de perturbation membranaire de ces peptides modèles. Dans les études des interactions lipides/peptides, nous nous intéressons plus particulièrement aux interactions hydrophobes puisqu'elles sont responsables de l'insertion des peptides dans les membranes lipidiques et qu'elles ont un rôle prépondérant dans l'activité cytotoxique des peptides antimicrobiens (84, 85). Bien qu'il a été mentionné dans les sections précédentes que l'activité antimicrobienne augmente avec le caractère cationique, les peptides 14- et 21-mères ont été étudiés sous une forme non cationique. D'un point de vue mécanistique, l'étude de tels peptides permet de maximiser les interactions hydrophobes avec les membranes sans l'influence des forces électrostatiques. Les interactions membranaires des peptides 14- et 21-mères ont été étudiées sur des membranes lipidiques modèles par spectroscopies de RMN à l'état solide et infrarouge. Une meilleure compréhension des modes d'action des peptides 14- et 21-mères permettra d'apporter les modifications structurales appropriées pour favoriser la sélectivité et l'efficacité de leur activité biologique, qu'elle soit antimicrobienne ou cytotoxique.

1.5 Membranes biologiques (103, 104)

Les membranes biologiques, avec les organites cellulaires, sont l'un des principaux constituants des cellules vivantes. Elles sont des matrices très complexes composées de

plusieurs molécules. Tel qu'illustré à la Figure 1.9, les membranes biologiques sont des assemblages de molécules lipidiques et protéiques maintenues ensemble par des interactions non covalentes de type électrostatique, hydrophobe et van der Waals (105, 106).

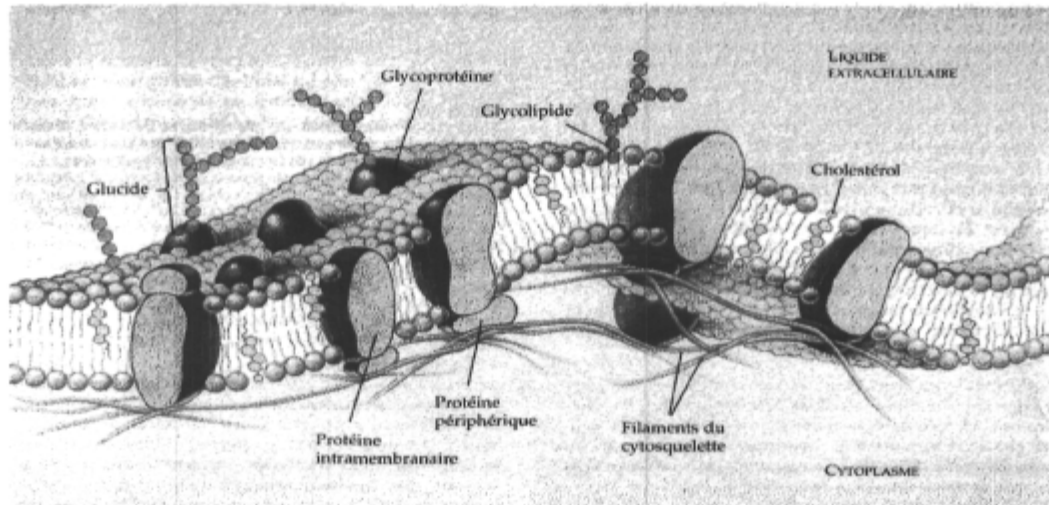


Figure 1.9: Schéma détaillé de la structure et des constituants d'une membrane biologique d'une cellule animale (107).

Les trois principaux types de lipides constituant les membranes biologiques sont les phospholipides, le cholestérol et les glycolipides (103). Ces trois molécules sont de nature amphiphile, c'est-à-dire qu'elles possèdent à la fois une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. En milieu aqueux, ces molécules amphiphiles s'organisent de manière à minimiser l'exposition de leurs régions hydrophobes au milieu aqueux. Ainsi, les molécules lipidiques s'organisent en une bicouche d'environ 4 à 5 nm d'épaisseur. Cette double couche lipidique est la structure de base de la membrane et son rôle est crucial dans la compartimentation, la protection et le maintien de l'équilibre électrochimique chez la cellule. La Figure 1.10 est une représentation des divers constituants membranaires retrouvés chez les cellules humaines et microbiennes. Cette figure rend compte de la

distribution asymétrique des constituants lipidiques dans les monocouches exo- et cytoplasmiques.

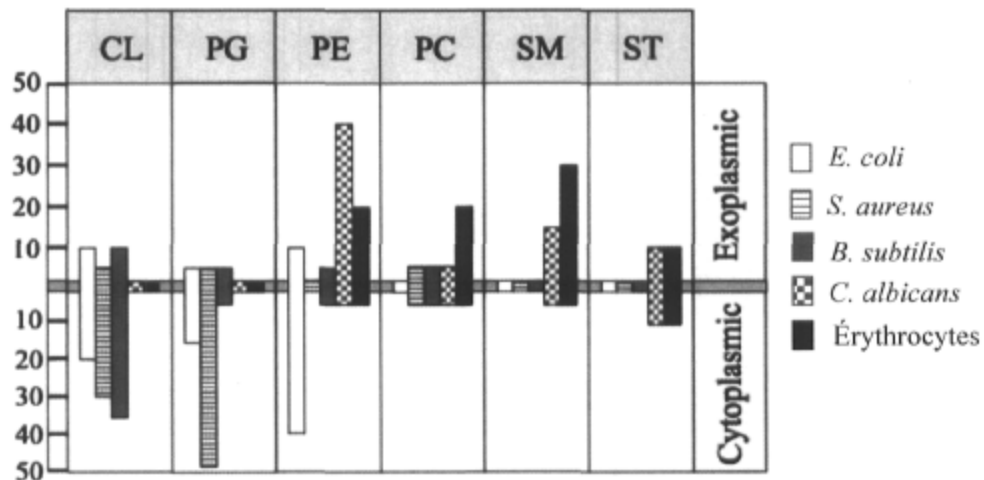


Figure 1.10: Nature et proportion des principaux constituants membranaires des cellules humaines et microbiennes pour les milieux cytoplasmiques et exoplasmiques: CL pour cardiolipine, PG pour phosphatidylglycérol, PE pour phosphatidyléthanolamine, PC pour phosphatidylcholine, SM pour sphingomyéline, et ST pour cholestérol/ergostérol (56).

Liées intimement à la bicouche lipidique, diverses protéines membranaires de types extrinsèque et intrinsèque sont le lieu de fonctions vitales chez la cellule telles que la reconnaissance, la communication, le transport et la catalyse. La bicouche lipidique est considérée comme un fluide bidimensionnel hautement dynamique où les constituants se déplacent continuellement dans le plan de la membrane. Ce modèle de la mosaïque fluide a été proposé en 1952 par Singer et Nicolson (108). Cette fluidité dépend grandement de la composition de la bicouche lipidique, que ce soit la nature des phospholipides ou la présence d'autres constituants membranaires tels que le cholestérol et les protéines.

Siège de nombreux phénomènes biologiques essentiels à la survie et au maintien de la cellule, la membrane biologique constitue à elle seule un vaste domaine de recherche. Dans cette section, nous nous concentrerons sur la nature, la structure et les propriétés de deux constituants des membranes biologiques soient les phospholipides et le cholestérol.

Nous verrons que les lipides peuvent s'organiser en une multitude d'arrangements ou phases lipidiques très dynamiques. Finalement, nous décrirons en détail les trois types de membranes modèles utilisés dans cette étude, soient les vésicules multilamellaires, les bicouches orientées entre des plaques de verre, et les bicelles. Ces membranes modèles simplifiées permettent des études plus spécifiques des interactions lipides/peptides sans qu'il n'y ait interférence avec les autres constituants membranaires complexes associés.

1.5.1 Phospholipides et cholestérol (105)

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons aux modes de perturbation membranaire de peptides amphiphiles modèles de 14 et 21 acides aminés. Compte tenu de la complexité des matrices lipidiques biologiques, nous avons recours à l'utilisation de membranes lipidiques modèles pour la réalisation de ces études. Il est difficile, voir impossible, de reproduire la composition exacte des membranes biologiques naturelles. Toutefois, l'utilisation de membranes modèles composées de phospholipides et de cholestérol, qui sont des constituants des membranes biologiques naturelles, permet de mimer ces matrices complexes.

1.5.1.1 Structure

La structure des phospholipides, ou diacylphosphoglycérides, se divise en quatre parties: les chaînes hydrocarbonées associées au groupement glycérol, le groupement glycérol, le groupement phosphate et la tête polaire fixée au groupement phosphate. Dans ce projet, nous avons étudié les interactions membranaires des peptides 14- et 21-mères avec des membranes modèles composées de cinq types différents de phospholipides. La structure générale des phospholipides est illustrée à la Figure 1.11 ci-dessous.

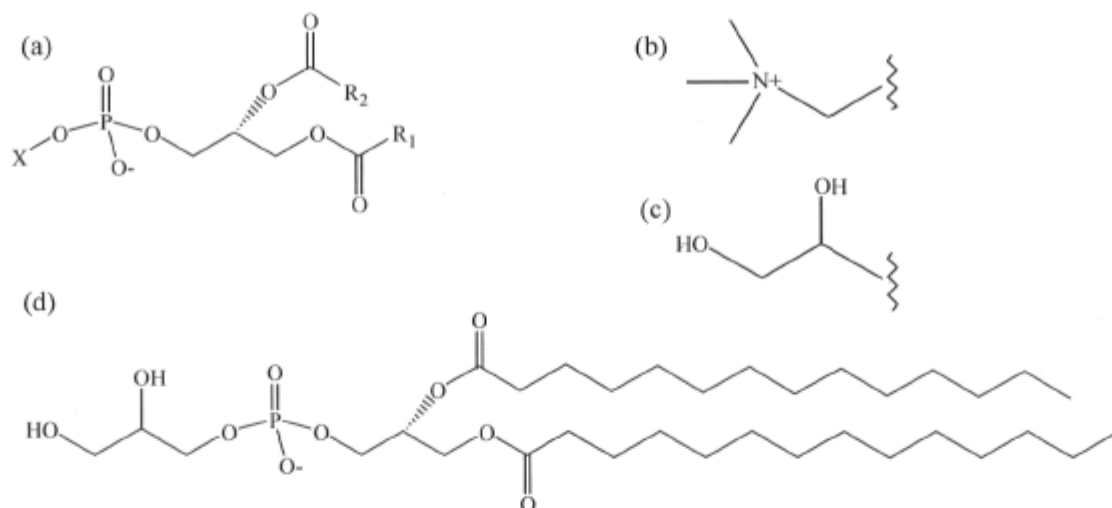


Figure 1.11: (a) Structure générale des phospholipides: chaînes hydrocarbonées R₁ et R₂ associées au groupement glycérol; groupement glycérol; tête polaire X fixée au groupement phosphate. Têtes polaires (b) choline et (c) glycérol. (d) Exemple du phospholipide DMPG.

Les phospholipides se caractérisent par la nature de la tête polaire et des chaînes hydrocarbonées hydrophobes dont la longueur est variable. La dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC), la dilaureoylphosphatidylcholine (DLPC), la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), et la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) sont des phospholipides qui possèdent tous une tête polaire choline, mais qui diffèrent par la longueur de leurs chaînes acyle. Les DHPC, DLPC, DMPC, et DPPC possèdent respectivement 6, 12, 14, et 16 atomes de carbone sur chacune des chaînes acyle R₁ et R₂. Le dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG; Figure 1.11(d)) diffère quant à lui du DMPC par sa tête polaire glycérol et sa nature anionique. Le groupement phosphate propre à tous les phospholipides est ionisable et son pK_a est compris entre 1 et 2 (105). Ainsi, en milieu aqueux, les phospholipides DHPC, DLPC, DMPC, et DPPC sont de nature zwitterionique, c'est-à-dire qu'ils comportent une charge positive à la tête choline et une charge négative au groupement phosphate. Compte tenu de la nature anionique des membranes bactériennes, le DMPG est un lipide grandement utilisé dans la constitution des membranes modèles de type bactérien. Les lipides phosphatidylcholines zwitterioniques sont quant à eux utilisés pour mimer les membranes neutres des cellules eucaryotes.

Le deuxième constituant membranaire en importance dans les membranes naturelles est le cholestérol. En concentration membranaire d'environ 30 %, il est couramment employé dans la composition des membranes modèles eucaryotes.

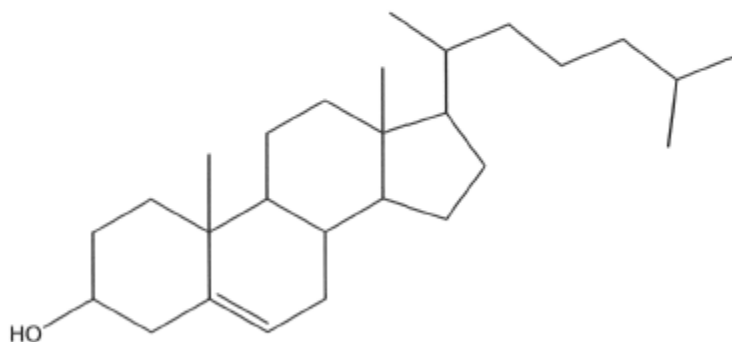


Figure 1.12: Structure du cholestérol.

Tel qu'illustré à la Figure 1.12, le cholestérol possède un noyau central hydrophobe composé de la juxtaposition de cycles, ainsi qu'une queue hydrocarbonée et un groupement hydroxyle polaire à chacune des extrémités respectives du noyau central. Lorsque insérée dans une bicouche lipidique, la molécule de cholestérol se positionne avec son groupement hydroxyle à proximité de la fonction carbonyle du groupement ester des phospholipides, et son noyau hydrophobe parallèle aux chaînes acyle des phospholipides (109). Le cholestérol est reconnu pour stabiliser et maintenir l'intégrité des bicouches lipidiques tout en modulant leur fluidité (110, 111).

1.5.1.2 Susceptibilité magnétique

Les phospholipides constituant les bicouches lipidiques possèdent une propriété appelée susceptibilité diamagnétique (112-115). Cette propriété magnétique s'explique par l'anisotropie du tenseur de susceptibilité magnétique χ des molécules lipidiques (112, 115). L'anisotropie de susceptibilité magnétique se définit comme suit:

$$\Delta\chi = \chi_{//} - \chi_{\perp} \quad (1.1)$$

L'anisotropie de susceptibilité magnétique $\Delta\chi$ est la différence entre les susceptibilités magnétiques parallèle $\chi_{//}$ et perpendiculaire χ_{\perp} par rapport à l'axe longitudinal de la molécule lipidique. Ainsi, dépendamment des valeurs de $\chi_{//}$ et χ_{\perp} , une molécule s'orientera préférentiellement soit de manière parallèle ou perpendiculaire au champ magnétique. Les molécules pour lesquelles $\Delta\chi > 0$ sont dites paramagnétiques et elles s'alignent de façon parallèle par rapport au champ B_0 . Les molécules pour lesquelles $\Delta\chi < 0$ sont dites diamagnétiques et elles s'alignent perpendiculairement au champ. L'équation 1.2 illustre la dépendance orientationnelle associée à l'énergie libre moyenne de Helmholtz $F(\beta)$:

$$F(\beta) = -\frac{1}{2} N \Delta\chi B_0^2 \cos^2 \beta \quad (1.2)$$

où β est l'angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique B_0 , N le nombre de molécules par unité de volume, et B_0 la valeur du champ magnétique. Les chaînes des phospholipides possèdent une susceptibilité magnétique négative, et l'énergie donnée par l'équation 1.2 sera minimale pour un angle β de 90° . Cet angle correspond à une orientation où l'axe longitudinal des chaînes acyle est perpendiculaire au champ magnétique B_0 . De façon moindre mais tout de même significative, la fonction carbonyle du groupement ester des phospholipides contribue également à favoriser cet alignement perpendiculaire compte tenu de sa susceptibilité magnétique positive et de son orientation relative de 90° par rapport aux chaînes acyle (voir Figure 1.11). Une des caractéristiques importantes de cette propriété magnétique des molécules est son additivité. Ainsi, pour un système lipidique où les molécules sont parallèles les unes aux autres, l'anisotropie de susceptibilité magnétique $\Delta\chi$ de chacun des lipides s'additionne et le degré d'orientation β d'un tel système est donné par l'équation suivante:

$$\beta = \frac{N\Delta\chi B_0^2}{k_B T} \quad (1.3)$$

où k_B est la constante de Boltzmann de valeur égale à $1,381 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$, et T la température absolue en Kelvin. Ainsi, plus le système comporte de molécules parallèles et plus le champ magnétique est intense, meilleur est le degré d'alignement β . Cette propriété est grandement exploitée dans le modèle membranaire des bicelles. De plus, l'utilisation d'ions paramagnétiques liés aux bicelles confère à ce système plusieurs utilités dans l'étude des interactions lipides/peptides. Ces membranes modèles sont décrites à la section 1.5.4. Les vésicules multilamellaires, dépendamment de leur composition et de leur fluidité, peuvent aussi être partiellement alignées dans le champ magnétique (113-116). Nous parlons alors de vésicules multilamellaires ellipsoïdes. Outre les ions paramagnétiques, d'autres molécules possédant des susceptibilités para- ou diamagnétiques, telles les peptides et protéines, peuvent également influencer le degré d'orientation des systèmes membranaires (112, 117, 118).

1.5.2 Organisation lipidique

La structure en bicouche décrite précédemment n'est que l'une des phases lipidiques pouvant exister pour des phospholipides en milieu aqueux (119). En effet, ceux-ci peuvent adopter des formes sphériques telles que les micelles et les vésicules uni- et multilamellaires, ainsi que des structures non lamellaires de type hexagonal, tel qu'illustré à la Figure 1.13. Dans ces organisations, les phospholipides s'associent pour former des structures permettant de limiter le contact entre les chaînes acyle hydrophobes et le milieu aqueux. Les forces hydrophobes, d'hydratation, de van der Waals, de liaisons hydrogène et électrostatiques maintiennent la stabilité de ces arrangements supramoléculaires (106, 120-122).

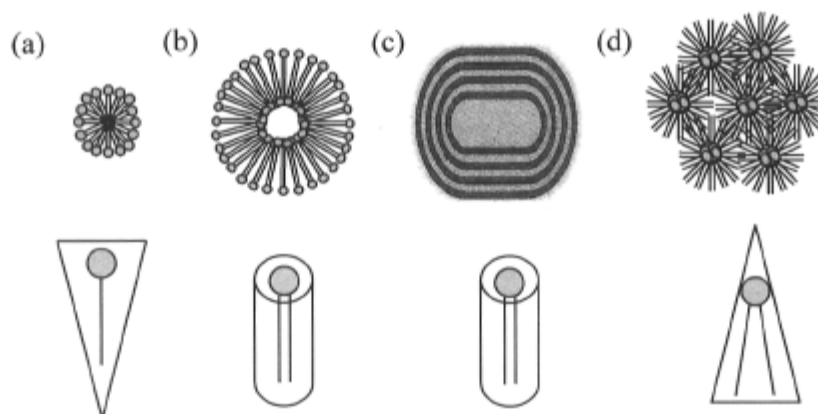


Figure 1.13: Organisations et morphologies des molécules lipidiques correspondantes: (a) phase micellaire avec morphologie conique inversée, (b) phase lamellaire simple et (c) phase lamellaire multiple avec morphologie cylindrique, et (d) phase hexagonale inverse avec morphologie conique (119).

Tel qu'illustré à la Figure 1.13, la morphologie des lipides est un facteur influençant la formation des diverses phases lipidiques. Ainsi, les lipides de forme conique inverse favorisent les phases micellaires, les lipides de forme cylindrique adoptent majoritairement des structures en bicouches, alors que les lipides de forme conique tels les lipides phosphatidyléthanolamine sont sujets à former des phases hexagonales inverses. Les phases micellaires se forment lorsque les lipides sont dissous dans le milieu aqueux au-delà d'une concentration critique appelée concentration micellaire critique (CMC) et qui varie de 10^{-10} à 10^{-12} M. Les micelles ont des tailles de plusieurs dizaines d'Angströms (Å). Les vésicules unilamellaires peuvent avoir diverses tailles. Les petites vésicules unilamellaires (SUVs) ont une taille approximative de 100 nm, alors que les grandes vésicules unilamellaires (LUVs) ont une taille variant de 0,1 à 2 μm (123). Les vésicules multilamellaires sont quant à elles de grosses structures lipidiques de l'ordre du micron.

1.5.3 Dynamique membranaire (105, 124)

Les membranes biologiques sont considérées comme des fluides bidimensionnels où les divers constituants sont animés de mouvements très diversifiés (124). Ces mouvements confèrent à la membrane lipidique une fluidité essentielle à plusieurs processus cellulaires.

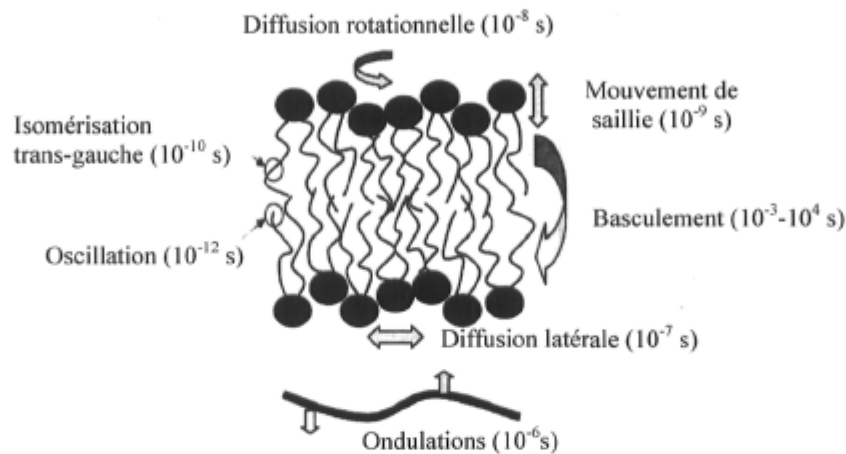


Figure 1.14: Mouvements des molécules de lipides à l'intérieur des membranes fluides et temps de corrélation moyens qui y sont associés (124).

La Figure 1.14 schématise les divers mouvements des lipides ainsi que leur échelle de temps relative à l'intérieur des membranes lipidiques fluides. Les lipides tournent autour de leur axe longitudinal, ils diffusent latéralement dans le plan de la bicouche, et certains lipides sont animés de mouvement de bascule d'une monocouche à l'autre et de mouvement de saillie. Les chaînes hydrocarbonées sont animées d'un mouvement de balancier et sont sujettes à l'isomérisation trans-gauche. La matrice lipidique dans son ensemble est également assujettie à des mouvements d'ondulation. L'ensemble de ces mouvements confère à la bicouche une fluidité qui à son tour peut influencer sur les mouvements d'autres constituants membranaires telles les protéines intrinsèques et extrinsèques. La viscosité membranaire est évaluée à environ $0,1 \text{ N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$, alors que celle de l'eau est de $10^{-3} \text{ N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ (105). Les paramètres modulant la fluidité membranaire sont la

température et la composition de la membrane. À basse température, les chaînes hydrocarbonées des lipides sont majoritairement dans une conformation tout-trans. En augmentant la température, il y a introduction de conformères gauche par rotation autour des liens simples C-C des chaînes acyle et la membrane se trouve dans un état de désordre conformationnel. La température à laquelle se produit cette transition d'une phase ordonnée à une phase désordonnée s'appelle température de transition de phase. La température de transition de phase dépend à la fois de la nature des têtes polaires et des chaînes acyle, de même que de leur longueur.

1.5.4 Systèmes de membranes modèles

Compte tenu de la complexité des matrices lipidiques naturelles, nous avons recours à l'utilisation de membranes lipidiques modèles pour étudier les interactions membranaires des peptides amphiphiles synthétiques 14- et 21-mères. L'utilisation de membranes modèles dans l'étude des interactions lipides/peptides permet d'avoir un contrôle rigoureux de la composition des membranes et permet de modifier de façon sélective la nature des bicouches lipidiques et les rapports molaires lipides/peptides (39, 125). Les trois types de membranes modèles utilisés dans cette étude sont les vésicules multilamellaires, les bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre et les bicelles. Une brève description de la formation et de l'utilité de chacune des membranes modèles sera faite dans cette section.

1.5.4.1 Vésicules multilamellaires

Les vésicules multilamellaires (MLVs) sont constituées d'une multitude de bicouches phospholipidiques sphériques, concentriques et espacées les unes des autres par des couches d'eau. Les vésicules multilamellaires utilisées dans ce projet sont formées à partir des phospholipides en poudre auxquels nous ajoutons une quantité d'eau. La suspension est alors soumise à une série de cycles de gel dans l'azote liquide (-195°C), de dégel à une température supérieure à la température de transition de phase des

phospholipides, et d'agitation (vortex) pour ainsi permettre l'hydratation et l'homogénéisation de la suspension lipidique, et la formation des vésicules multilamellaires (123). Les vésicules multilamellaires ont une distribution de taille hétérogène variant de 0,1 à 10 μm (123).

Lorsque les expériences de RMN ne requièrent pas l'orientation des membranes lipidiques dans le champ magnétique B_0 pour tirer avantage de la dépendance orientationnelle des interactions anisotropes, les vésicules multilamellaires constituent un excellent système membranaire pour l'étude des interactions lipides/peptides. Leur préparation est relativement simple et leur composition lipidique peut être variée aisément. Ceci permet la création de membranes modèles à plusieurs composantes s'apparentant davantage à la composition des membranes biologiques ciblées. Les vésicules multilamellaires peuvent être étudiées à diverses températures, donnant ainsi lieu aux phases gel et fluide des phospholipides. Comme les membranes biologiques naturelles sont en phase fluide, la majorité des études lipides/peptides s'effectue dans un état désordonné obtenu à une température supérieure à la température de transition de phase du phospholipide. Dans les cas particuliers où la dynamique membranaire doit être minimisée, les études peuvent s'effectuer sur des MLVs hydratées et gelées, ou sur des MLVs lyophilisées (126, 127).

1.5.4.2 Bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre

Les bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre sont couramment utilisées lorsque les expériences de RMN requièrent des échantillons orientés dans le champ magnétique B_0 (128). La formation de ces membranes modèles demande davantage de minutie que dans le cas des vésicules multilamellaires (129). Les lipides, avec ou sans le peptide, sont dissous dans un solvant organique tel que le chloroforme et déposés précautionneusement sur des plaques de verre. Une fois le solvant organique évaporé, les plaques de verre sont empilées les unes sur les autres et placées à l'étuve dans une chambre

humide pour l'hydratation des bicouches lipidiques. Une fois les bicouches hydratées, les plaques de verre sont scellées dans un film de parafilm.

Mis à part leur préparation plutôt longue et minutieuse, les bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre comportent de nombreux avantages. Premièrement, de par l'orientation uniaxiale des molécules de lipides et des peptides, elles permettent de tirer avantage de la dépendance orientationnelle des interactions de spins nucléaires (130-133). En utilisant une bobine appropriée, l'orientation des bicouches lipidiques peut être interconvertie entre des orientations où la normale à la bicouche est soit parallèle ou perpendiculaire au champ magnétique B_0 . De plus, ces membranes modèles offrent la possibilité d'étudier les interactions lipides/peptides sur une gamme très grande de température, de concentration lipidique et peptidique, et de composition en lipides. En effet, l'utilisation de lipides aux chaînes acyle insaturées donne une phase lipidique davantage fluide, alors que l'utilisation de lipides chargés augmente l'épaisseur des couches d'eau interstitielle entre les bicouches lipidiques (129). Même si ce type de système orienté ne permet pas l'étude d'une grande quantité d'échantillon compte tenu que le volume occupé par les plaques de verre est largement supérieur au volume total d'échantillon, il demeure un système permettant une grande variabilité des facteurs expérimentaux.

1.5.4.3 Bicelles (134, 135)

Les bicelles constituent le deuxième type de membranes modèles orientées que nous avons utilisé dans le cadre de cette étude. Terme proposé par Sanders et coll. pour « *binary bilayered mixed micelles* », les bicelles sont composées de phospholipides à courtes et longues chaînes, généralement les phospholipides DHPC et DMPC s'organisant sous forme de micelles discoïdales (136-138). Plusieurs autres systèmes lipidiques binaires ont toutefois précédé le développement des bicelles, tels que les SLUVs pour « *short-chain/long-chain unilamellar vesicles* » (139, 140), et les mélanges binaires sels biliaires:phospholipides de type glycocholate de sodium/DMPC et de sulfate de 3-(cholamidopropyl)diméthylammonio-2-hydroxyl-1-propane (CHAPSO)/DMPC (141, 142).

Cependant, la nature phospholipidique de la composante « détergente » DHPC fait en sorte que les bicelles ont remplacé les systèmes de sels biliaires/DMPC et CHAPSO/DMPC dans la grande majorité des études des interactions lipides/peptides.

Dépendamment des rapports molaires (q) de [DMPC]/[DHPC], les bicelles peuvent avoir diverses tailles donnant lieu à différentes applications. Pour des ratios $q < 1,0$, les bicelles formées sont de petite taille, avec un diamètre moyen variant de 60 Å à quelques centaines d'Angströms et une épaisseur d'environ 40 Å (143-147). Ces bicelles sont appelées « fast-tumbling bicelles » puisqu'elles se réorientent très rapidement en solution. Ces bicelles permettent des études à haute résolution des interactions lipides/peptides par la RMN en solution (134, 145, 148, 149). Cependant, pour des ratios q compris entre 2,8 et 6,5, les bicelles s'alignent spontanément avec la normale à la bicouche perpendiculaire au champ magnétique B_0 . Cette gamme de ratios q donne lieu à des bicelles de diamètre et d'épaisseur variant de 100-1000 Å et de 40-60 Å, où l'ajout de sels peut moduler la taille des bicelles de même que stabiliser leur orientation (150, 151). Cette orientation préférentielle par rapport au champ magnétique est expliquée par l'additivité de la susceptibilité diamagnétique des chaînes acyle des phospholipides empilées parallèlement les unes aux autres. De façon générale, l'alignement des bicelles survient à des températures supérieures à la température de transition de phase du phospholipide à longues chaînes, sur une gamme de température allant de 30°C à 50°C, pour des rapports molaires $q \geq 2,5$, et à des concentrations lipidiques comprises entre 3 et 40 % (w/v) (136, 152).

Plusieurs facteurs peuvent affecter à la fois les domaines de formation et d'orientation des bicelles tels que la température, la concentration lipidique totale, le ratio q [DMPC]/[DHPC], et la présence d'autres lipides (151, 153). Plusieurs exemples sont rapportés dans la littérature concernant la modification des bicelles classiques DMPC/DHPC par l'ajout d'autres constituants membranaires dans le but d'augmenter les domaines d'application de ces membranes modèles. En effet, des bicelles auxquelles ont été ajoutés des lipides anioniques et cationiques, de la cardioline, de la

phosphatidyléthanolamine (PE), et du cholestérol (154-158) se sont avérées de bons modèles pour promouvoir la liaison de peptides chargés, pour mimer les cellules mitochondriales, eucaryotes, procaryotes, et les érythrocytes. La modification des bicelles avec des phospholipides à longues chaînes de longueur variable (159, 160), avec des phospholipides insaturés (159) ou avec des phospholipides « éther » en remplacement du groupement ester (161-163) permet de moduler leur stabilité sous diverses conditions expérimentales de pH, de température, et selon la nature des peptides en interaction avec celles-ci (160). Finalement, l'addition de sels paramagnétiques tels que les lanthanides possédant une susceptibilité magnétique positive importante permet de faire basculer les bicelles dans une orientation où la normale à la bicouche est parallèle au champ magnétique (164-167). Ces ions paramagnétiques sont reconnus pour se lier au groupement phosphate des phospholipides. Cependant, l'ajout d'agents lipidiques chélatants tels que la dimyristoylphosphatidyléthanolamine-diéthylènetriaminepentaacétate (DMPE-DTPA) séquestre ces ions loin du groupement phosphate (168, 169). Ce nouvel alignement par rapport au champ magnétique B_0 ouvre la porte aux études structurales et orientationnelles de molécules aux mouvements à symétrie axiale limités (165, 170-174).

Très controversées, la structure et la morphologie des bicelles ont grandement été étudiées en fonction de la température et du rapport molaire q dans le but de proposer un modèle structural concordant avec les données expérimentales obtenues par diverses techniques. Sanders et coll. ont été les premiers à proposer un modèle de bicelles sous forme de micelles discoïdales (136). Appuyé par d'autres études, le modèle suggère que les phospholipides à longues chaînes DMPC forment la région plane, alors que les phospholipides à courtes chaînes DHPC sont localisés majoritairement sur le tore présentant un fort rayon de courbure (136, 138). Les auteurs insistent cependant sur le fait que les résultats obtenus par la RMN concordent avec cet arrangement lipidique, mais ne le confirme pas exclusivement. Les études réalisées en diffraction des neutrons (*Small Angle Neutron Scattering*) par le groupe de Katsaras suggèrent plutôt un modèle bicellaire sous forme d'une structure en bicouche ou lamellaire de phospholipides DMPC interrompue par des pores formés par les phospholipides DHPC (175-178). Ces arrangements de type « Swiss Cheese » ne proviendraient pas d'agrégats purs de DHPC et DMPC mais plutôt de

petites bicelles mixtes qui se fusionnent avec une augmentation de la température pour adopter de plus grosses structures. Ces lamelles lipidiques plus volumineuses expliqueraient le mécanisme d'alignement des bicelles et l'augmentation de viscosité des solutions DMPC/DHPC avec la température. Ce modèle est également proposé par Rowe et coll. à la suite d'études de fluorescence par transfert d'énergie de résonance (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (179). Des études ultérieures de SANS ont amené le groupe de Katsaras à proposer un nouveau modèle formé de rubans de DMPC interconnectés et dont les bords sont occupés par les lipides DHPC (180, 181). Triba et coll. suggèrent quant à eux un modèle de bicelle mixte de forme discoïdale où les phospholipides DMPC et DHPC occupent à la fois les régions planaires et toroïdales (182). Ils ont démontré par la RMN du phosphore-31 que l'augmentation de température accroît la miscibilité du DHPC dans la région planaire, et que cette miscibilité serait responsable de l'augmentation de la taille des bicelles et de la viscosité de la solution. Malgré la multitude de modèles structuraux proposés, les bicelles demeurent un excellent choix de membranes modèles. Il a effectivement été démontré que plusieurs enzymes et protéines adoptent leur conformation native et demeurent fonctionnelles lorsqu'incorporées dans des bicelles (137, 174, 183, 184). L'organisation lipidique des bicelles procure donc un environnement propice aux études structurales des peptides et protéines.

1.6 Objectifs spécifiques

Dans ce projet de recherche, nous nous sommes intéressés aux modes de perturbation membranaire des peptides 14- et 21-mères. Dans une perspective de développement de nouveaux agents antimicrobiens, une meilleure compréhension des interactions membranaires impliquées pour les peptides 14- et 21-mères permettra de leur apporter les changements structuraux requis aux activités biologiques désirées.

Les résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus par l'utilisation de deux techniques spectroscopiques, soient les spectroscopies de RMN à l'état solide et infrarouge à transformée de Fourier. La spectroscopie de RMN à l'état solide tire avantage de la

dépendance orientationnelle des interactions de spins nucléaires pour obtenir de l'information sur la conformation, la dynamique, l'orientation, l'ordre et la structure de constituants de systèmes biologiques. De façon complémentaire à la spectroscopie de RMN, la spectroscopie IR-TF permet l'étude simultanée de la conformation et de la structure de constituants biologiques, et de plusieurs groupements fonctionnels sur une même molécule. Ces deux techniques spectroscopiques nous ont permis d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de perturbation membranaire des peptides 14- et 21-mères en interaction avec des membranes lipidiques modèles.

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'effet des peptides 14- et 21-mères sur diverses régions de bicouches lipidiques modèles. Cette section de résultats est divisée en trois parties: l'étude de la tête polaire et des régions interfaciales et hydrophobes des bicouches lipidiques. Plus spécifiquement, l'étude de la tête polaire des phospholipides a été effectuée par spectroscopie de RMN du phosphore-31, où l'analyse de la forme du spectre et de l'anisotropie de déplacement chimique du noyau ^{31}P permet d'obtenir de l'information sur la dynamique et/ou de l'orientation des têtes polaires des lipides en interaction avec les peptides. La spectroscopie IR-TF a permis l'étude de la région interfaciale des bicouches lipidiques caractérisée par le groupement carbonyle de la fonction ester des phospholipides. Ainsi, une analyse du mode d'élongation du groupement carbonyle des lipides en interaction avec les peptides 14- et 21-mères renseigne sur le profil d'hydratation et le patron de liaisons hydrogène à la région interfaciale des bicouches lipidiques. Finalement, l'utilisation de phospholipides possédant des chaînes acyle deutérées a permis la réalisation des expériences en spectroscopie de RMN du deutérium, où une analyse de l'écart quadripolaire pour diverses sections des chaînes hydrophobes fournit de l'information sur l'ordre orientationnel des molécules lipidiques.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à la détermination de la topologie et de la dynamique membranaires des peptides 14- et 21-mères en interaction avec des membranes lipidiques modèles. Par spectroscopie de RMN de l'azote-15 et par l'utilisation de peptides sélectivement marqués de cet isotope, il nous a été possible de déterminer l'orientation membranaire des peptides 14- et 21-mères incorporés à des bicouches

lipidiques orientées entre des plaques de verre. La dynamique membranaire du peptide 21-mère a par la suite été déterminée par spectroscopie de RMN du carbone-13 sous les conditions de rotation à l'angle magique. En tournant à une vitesse suffisamment basse pour moyenniser partiellement l'anisotropie de déplacement chimique du noyau ^{13}C du groupement carbonyle de la fonction amide de l'acide aminé sélectivement marqué de cet isotope, il y a génération de bandes de rotation à partir desquelles nous extrayons une information qualitative de la dynamique membranaire de ce site sur l'unité peptidique. Par la suite, nous avons tiré profit de la dépendance en r^3 du couplage dipolaire entre deux noyaux pour étudier la localisation membranaire du peptide 14-mère. La détermination de la valeur du couplage dipolaire entre les noyaux ^{15}N du peptide 14-mère et ^{31}P des têtes polaires des phospholipides permet la mesure de distances hétéronucléaires intermoléculaires, fournissant ainsi une information quantitative quant à la proximité du peptide par rapport aux têtes polaires des lipides.

À la lumière des résultats obtenus de ces techniques spectroscopiques et de leurs analyses présentés aux chapitres 3 à 6, nous avons été en mesure de proposer des mécanismes de perturbation membranaire pour les peptides 14- et 21-mères en interaction avec des bicouches lipidiques. L'ensemble des résultats de RMN et IR-TF apporte une meilleure compréhension des interactions membranaires impliquées dans les mécanismes d'action des peptides 14- et 21-mères, et ouvre la voie aux changements structuraux à apporter à ces peptides synthétiques pour en faire de nouveaux agents antimicrobiens possédant les activités biologiques désirées.

Chapitre 2

Spectroscopies de résonance magnétique nucléaire et infrarouge pour l'étude des interactions lipides/peptides

Les résultats présentés dans cette thèse portent sur l'étude des interactions entre des peptides amphiphiles synthétiques et diverses membranes lipidiques modèles non-orientées et orientées dans le champ magnétique. Les peptides étudiés sont constitués de 14 et 21 acides aminés stratégiquement positionnés dans la séquence primaire de manière à conférer aux peptides hélicoïdaux un caractère amphiphile essentiel à l'interaction avec des membranes lipidiques. Bien que les études antérieures ont démontré une activité membranaire intéressante pour les peptides 14- et 21-mères, ces études n'ont pas permis de déterminer avec précision leurs mécanismes de perturbation membranaire. Afin d'apporter davantage d'information sur les interactions impliquées entre les peptides 14- et 21-mères et les membranes lipidiques, et ainsi proposer un mécanisme de perturbation membranaire approprié, nous avons eu recours à deux techniques complémentaires, soit les spectroscopies de résonance magnétique nucléaire à l'état solide et infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF). Dans un premier temps, ces deux techniques nous ont permis d'étudier les effets des peptides sur diverses régions des membranes modèles par la RMN du phosphore-31 et du deutérium, ainsi que par l'analyse de l'élongation du lien carbonyle du groupement phosphodiester des lipides. Dans un second temps, la RMN de l'azote-15 et du carbone-13, ainsi que la technique « *REDOR* » ont fourni de l'information quant aux contraintes d'orientation, de dynamique et de distance des peptides 14- et 21-mères en interaction avec les membranes lipidiques modèles. Ces méthodes spectroscopiques complémentaires seront expliquées en détail dans ce chapitre, avec les fondements théoriques qui s'y rapportent.

2.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide

Les applications de la spectroscopie de RMN n'ont cessé de croître depuis les toutes premières expériences de RMN dans les années 1940-1950 par Felix Bloch à Stanford et Edward Purcell à Harvard (185-188), et pour lesquelles ils reçurent le prix Nobel de physique en 1952. Dans cette section, nous aborderons les concepts de base de la résonance magnétique nucléaire, et nous présenterons en détail les diverses techniques de RMN utilisées dans cette thèse en insistant sur les aspects théoriques pertinents à l'étude des interactions peptides/membranes.

2.1.1 Concepts fondamentaux

2.1.1.1 Moment angulaire de spin et aimantation nucléaire

La résonance magnétique est un phénomène que l'on rencontre dans les systèmes possédant à la fois des moments angulaire et magnétique, tels les électrons et les noyaux atomiques. Toutefois, pour qu'un noyau soit actif en RMN, celui-ci doit posséder un moment angulaire de spin \vec{I} non nul. Le moment angulaire (ou spin) est une propriété quantique intrinsèque aux particules et dont les valeurs dépendent du nombre quantique de spin I tel qu'illustré ci-contre:

$$\text{Valeurs de } \vec{I} = \frac{[I(I+1)]^{1/2} h}{2\pi} \quad (2.1)$$

où \vec{I} est le moment angulaire de spin, I le nombre de spin et h la constante de Planck de valeur égale à $6,626 \times 10^{-34}$ J·s. Le moment angulaire \vec{I} peut prendre $(2I+1)$ orientations dans l'espace selon un axe appelé axe z ou B_0 . La projection de I sur l'axe z , soit I_z , prend la forme suivante:

$$I_z = m\hbar \quad (2.2)$$

où m est le nombre quantique magnétique pouvant prendre $(2I+1)$ valeurs possibles, et \hbar la constante de Planck divisée par 2π . Ainsi pour les noyaux de spin $\frac{1}{2}$ tels que ^1H , ^{13}C , ^{15}N et ^{31}P , nous retrouvons deux orientations possibles selon l'axe z , soit $I_z = \pm\frac{1}{2}\hbar$. Pour les noyaux deutérium ^2H et azote ^{14}N de spin 1, nous retrouvons trois orientations suivant l'axe z , soit $I_z = 0, \pm 1\hbar$.

Un noyau possédant un moment angulaire \vec{I} non nul possède également un moment magnétique $\vec{\mu}$ qui lui est lié selon la relation suivante:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I} \quad (2.3)$$

où $\vec{\mu}$ et \vec{I} sont les moments magnétique et angulaire de spin, et γ le rapport gyromagnétique caractéristique à chaque noyau atomique. Pour les noyaux de γ positif, les moments angulaire et magnétique sont parallèles, contrairement aux noyaux de γ négatif où ces moments présentent des orientations antiparallèles (voir Figure 2.1(a)).

2.1.1.2 Effet du champ magnétique et fréquence de Larmor (189)

En l'absence d'un champ magnétique, les vecteurs moment magnétique $\vec{\mu}$ présentent tous la même énergie, et on parle alors de niveaux d'énergie dégénérés. Toutefois, en présence d'un champ magnétique B_0 aligné suivant l'axe z , il y a une levée de cette dégénérescence et l'énergie associée au moment magnétique $\vec{\mu}$ est donnée par:

$$E = -\mu_z B_0 = -m\gamma\hbar B_0 \quad (2.4)$$

où μ_z est la composante du moment magnétique $\vec{\mu}$ selon l'axe z , et B_0 le champ magnétique externe appliqué. Tel qu'illustré à la Figure 2.1(b), pour un noyau de spin $1/2$, il y aura deux états d'énergie donnés correspondant aux $(2I+1)$ valeurs possibles du nombre magnétique m , soient $+1/2$ et $-1/2$. Ces états sont communément appelés états α et β . En spectroscopie de RMN, seules les transitions pour lesquelles $\Delta m = \pm 1$ correspondant à des niveaux d'énergie adjacents sont possibles. La différence d'énergie entre ces niveaux est donnée par:

$$\Delta E = h\nu = \gamma\hbar B_0 \quad (2.5)$$

où ν est la fréquence de la radiation électromagnétique donnant lieu à la transition ΔE d'un niveau d'énergie $m = +1/2$ à $m = -1/2$. Puisque les noyaux possèdent des moments angulaire et magnétique, ceux-ci sont animés d'un mouvement de précession autour du vecteur champ magnétique \vec{B}_0 . Chaque spin nucléaire précesse autour du champ magnétique à une fréquence qui leur est intrinsèque puisqu'elle dépend directement de leur rapport gyromagnétique, mais aussi du champ magnétique, tel que décrit ci-contre:

$$\nu(\text{Hz}) = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.6)$$

Le signe donné à la fréquence de Larmor dépend du sens de précession des spins nucléaires, sens qui dépend à son tour du rapport gyromagnétique. Ainsi, pour un noyau de γ positif, la précession de Larmor sera de sens horaire et l'état de spin α sera celui de plus faible énergie. Pour un noyau de γ négatif il y aura précession dans le sens anti-horaire et l'état de plus faible énergie sera l'état β .

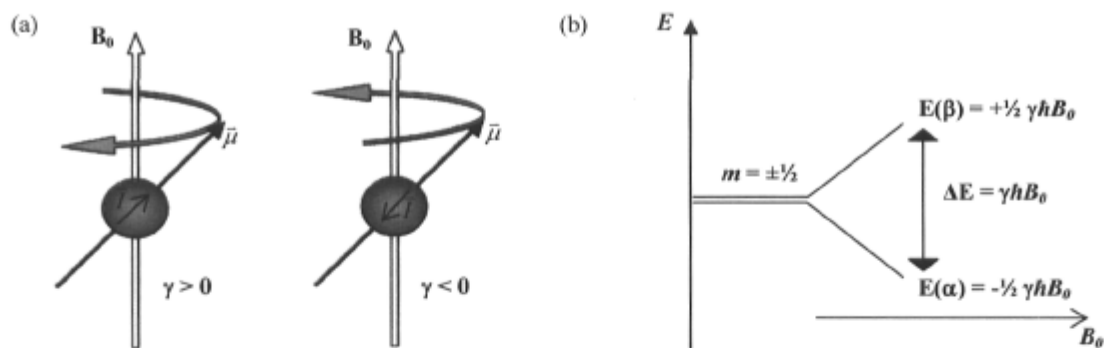


Figure 2.1: (a) Mouvement de précession des spins $\frac{1}{2}$ de rapport gyromagnétique positif et négatif autour du champ magnétique B_0 aligné selon l'axe z . (b) Transitions entre les niveaux d'énergie $-\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0$ et $+\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0$ correspondant aux états α et β pour un spin $\frac{1}{2}$.

Le tableau 2.1 donne une liste détaillée des divers noyaux étudiés dans cette thèse, en spécifiant leur spin, leur abondance naturelle, leur rapport gyromagnétique, ainsi que leurs fréquences de Larmor pour diverses valeurs de champ magnétique B_0 .

Tableau 2.1: Spin, abondance naturelle, rapport gyromagnétique et fréquences de Larmor des noyaux étudiés pour divers champs magnétiques B_0 .

Noyaux étudiés	Spin I	Abondance naturelle (%)	Rapport gyromagnétique γ ($10^7 \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Fréquences de Larmor (MHz)	
				7,05 T	9,4 T
^1H	$\frac{1}{2}$	99,985	26,75	300,0	400,0
^{31}P	$\frac{1}{2}$	100	10,84	121,4	161,9
^2H	1	0,015	4,11	46,1	61,4
^1N	$\frac{1}{2}$	0,37	-2,71	30,4	40,5
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1,1	6,73	75,4	100,6

2.1.1.3 Impulsion de radiofréquence et relaxation (190-192)

Selon la distribution de Boltzmann pour un système à l'équilibre et en présence d'un champ magnétique, les spins nucléaires composant un échantillon se répartissent entre les états d'énergie α et β , avec un léger excès dans le niveau d'énergie inférieur α , tel que démontré dans l'équation ci-contre:

$$\frac{N_{-\frac{1}{2}}}{N_{+\frac{1}{2}}} = \exp^{-\Delta E/k_B T} \quad (2.7)$$

où N est la population associée aux états d'énergie α et β , ΔE la différence d'énergie entre les niveaux α et β , et k_B la constante de Boltzmann. Cette polarisation anisotrope génère une aimantation nette dans la direction du champ magnétique externe B_0 , tel qu'illustré à la Figure 2.2. L'intensité de la transition observée sera d'autant plus importante que la différence ΔE entre les niveaux d'énergie est grande.

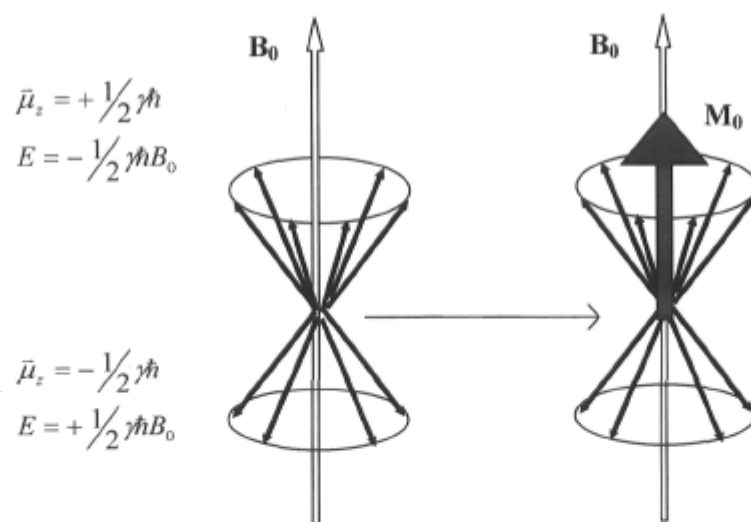


Figure 2.2: Excès de spins nucléaires dans le niveau d'énergie α générant une aimantation nette M_0 selon l'axe z , la direction du champ magnétique B_0 .

Au cours d'une expérience de RMN, une impulsion de radiofréquence est appliquée perpendiculairement au champ magnétique externe B_0 . Pour qu'il y ait absorption de radiofréquence donnant ainsi lieu au phénomène de résonance magnétique, le champ magnétique B_1 appliqué doit osciller à la fréquence de Larmor caractéristique du noyau à l'étude. Lorsqu'il y a absorption de radiofréquence, les spins précessionnant originalement autour de B_0 voient leur moment magnétique basculer dans le plan xy , précessionnant pendant un certain temps autour de B_1 et générant ainsi une aimantation transversale M_{xy} dans le plan xy détectable en RMN. La radiofréquence appliquée induit des transitions entre les états d'énergie α et β et après un certain temps, il y a équilibre des populations entre les états d'énergie α et β . Dans cet état de saturation, il n'y a plus d'absorption nette de radiofréquence et donc plus de signal de RMN observable.

Lorsque les impulsions de radiofréquences cessent, le système revient naturellement à son état d'équilibre en échangeant de l'énergie avec le milieu. Ce transfert d'énergie se fait via des interactions avec les champs magnétiques environnants du réseau oscillant à la fréquence de Larmor ν_0 du noyau. Ce retour à l'équilibre s'appelle relaxation longitudinale ou spin-réseau et donne lieu à un signal de précession libre (ou FID pour *Free Induction Decay*) dont l'amplitude décroît en fonction d'un certain temps t . Ceci a pour effet de diminuer l'aimantation transversale M_{xy} et d'accroître la composante de l'aimantation M_0 selon l'axe z , aimantation appelée M_z , selon l'équation suivante:

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad (2.8)$$

où t est le temps nécessaire pour que M_0 revienne à l'équilibre, et T_1 le temps pour recouvrir 63 % de l'aimantation initiale M_0 selon l'axe z . Le temps de relaxation longitudinale T_1 se mesure expérimentalement via une séquence d'impulsions dite « d'inversion-recouvrement » et qui prend la forme abrégée suivante: *Équilibration* - 180_x° - τ - 90_x° - *Acquisition*. Le temps T_1 est très sensible à

l'environnement du noyau et est donc un bon indicateur de la dynamique locale entourant le noyau.

Il existe un autre mécanisme de relaxation qui, contrairement à la relaxation longitudinale qui se produit suivant l'axe z , décroît l'aimantation transversale M_{xy} . Il s'agit de la relaxation transversale ou spin-spin qui se produit sans transfert d'énergie avec le réseau et qui affecte directement la largeur des raies. La relaxation transversale s'exprime comme suit:

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2^*} \quad (2.9)$$

où T_2^* est le temps de relaxation transversale effectif qui tient compte de l'inhomogénéité du champ magnétique à l'intérieur de l'échantillon. La mesure de temps de relaxation T_2 intrinsèque se fait par l'utilisation d'une séquence d'impulsions de type « écho » qui élimine les inhomogénéités du champ magnétique. Le temps de relaxation T_2 se traduit par une perte de la cohérence des spins dans le plan xy , et la séquence d'impulsions est schématisée de la façon suivante: *Équilibration* – 90_x° – τ – 180_x° – τ – *Acquisition*. Le temps de relaxation T_2 est également influencé par l'environnement du spin nucléaire, mais aussi par des facteurs d'échange chimique entre les spins. Pour les échantillons animés de mouvements rapides, les domaines de temps de T_1 et T_2 sont du même ordre de grandeur, alors que pour les échantillons animés de mouvements lents comme ceux que nous étudions en spectroscopie de RMN à l'état solide, le T_2 est plus court que le T_1 .

2.1.2 Interactions de spins nucléaires en RMN à l'état solide (193)

Les spins nucléaires interagissant avec le champ magnétique externe et les champs magnétiques internes donnent lieu à un spectre de RMN. Ces interactions des spins avec

ces champs se regroupent en un seul Hamiltonien total \mathcal{H} qui décrit l'énergie totale E du système suivant l'équation de Schrödinger indépendante du temps:

$$\mathcal{H}\psi = E\psi \quad (2.10)$$

où ψ , la fonction d'onde du système, en l'occurrence du spin nucléaire, contient toute l'information quantique du spin. L'Hamiltonien total du système \mathcal{H} se divise en six Hamiltoniens décrivant chacune des interactions ressenties par un spin nucléaire dans un champ magnétique, comme ci-contre:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{RF} + \mathcal{H}_{CS} + \mathcal{H}_D + \mathcal{H}_J + \mathcal{H}_Q \quad (2.11)$$

où $\mathcal{H}_Z, \mathcal{H}_{RF}, \mathcal{H}_{CS}, \mathcal{H}_D, \mathcal{H}_J, \mathcal{H}_Q$ sont les Hamiltoniens décrivant les interactions de Zeeman (\mathcal{H}_Z), de radiofréquence (\mathcal{H}_{RF}), de déplacement chimique (\mathcal{H}_{CS}), de couplage dipolaire (\mathcal{H}_D), de couplage scalaire (\mathcal{H}_J) et de couplage quadrupolaire (\mathcal{H}_Q). Nous nous attarderons maintenant aux interactions $\mathcal{H}_Z, \mathcal{H}_{CS}, \mathcal{H}_D$ et \mathcal{H}_Q utiles à la compréhension des sections subséquentes.

2.1.2.1 Interaction de Zeeman

L'interaction de Zeeman se définit comme étant l'interaction d'un spin nucléaire avec le champ magnétique, et de cette interaction résulte une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie tel que démontré à la Figure 2.1(b). Plus le champ magnétique externe est important, plus les transitions donnant lieu aux résonances s'effectueront entre des niveaux d'énergie éloignés, et meilleure sera la sensibilité. Étant la plus importante de toute, l'interaction Zeeman est très faiblement perturbée par les autres interactions.

2.1.2.2 Interaction de déplacement chimique

Le déplacement chimique s'explique par le fait qu'un noyau expérimente un champ magnétique légèrement différent du champ magnétique externe B_0 dû à sa proximité d'autres atomes dont les électrons en mouvement engendrent de petits champs magnétiques B' qui se soustraient au champ externe B_0 . Nous disons alors que le noyau est blindé ou écranté. La valeur du champ B' est proportionnelle à celle du champ B_0 selon l'équation suivante:

$$B = B_0 - B' = B_0(1 - \sigma) \quad (2.12)$$

où B est le champ magnétique ressenti par le noyau et σ est la constante d'écran ou de blindage. Ainsi un noyau résonnera à une fréquence légèrement inférieure selon l'équation suivante:

$$\nu = \frac{\gamma B_0(1 - \sigma)}{2\pi} \quad (2.13)$$

Contrairement à la spectroscopie de RMN en solution où les molécules sont animées de mouvements rapides qui moyennent dans l'espace le tenseur d'écrantage électronique et donnent des raies au déplacement chimique isotrope, la spectroscopie de RMN à l'état solide étudie des systèmes aux mouvements moléculaires restreints dont le tenseur d'écrantage n'est plus moyenné dans l'espace. Nous obtenons des spectres de RMN larges appelés spectres de poudre. Nous parlons alors d'anisotropie de déplacement chimique. L'Hamiltonien \mathcal{H}_{CS} se définit comme suit:

$$\mathcal{H}_{CS} = \gamma \hbar \sigma_{zz} S_z B_0 \quad (2.14)$$

où

$$\sigma_{zz} = \sigma_{11} \cos^2 \alpha \sin^2 \beta + \sigma_{22} \sin^2 \alpha \sin^2 \beta + \sigma_{33} \cos^2 \beta \quad (2.15)$$

Les termes σ_{zz} et S_z représentent respectivement le tenseur de déplacement chimique et l'opérateur de spin nucléaire pour le noyau S . Les termes σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} sont les valeurs des éléments diagonaux du tenseur de déplacement chimique σ_{zz} , valeurs déterminées selon un système d'axe fixe dans la molécule, le système d'axes principal ou PAS, et ils nous renseignent sur la grandeur du tenseur σ_{zz} . Les valeurs des principaux éléments σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} fournissent de l'information tridimensionnelle sur l'anisotropie du tenseur d'écrantage au noyau, qui à son tour renseigne sur la structure moléculaire. Les angles α et β sont les angles d'Euler spécifiant l'orientation des axes du PAS par rapport au champ magnétique B_0 . Ces équations reflètent la dépendance orientationnelle du déplacement chimique par rapport au champ magnétique B_0 . Nous verrons en détail le concept d'anisotropie de déplacement chimique à la section 2.2.1 où il sera question de la RMN du phosphore-31 appliquée aux membranes biologiques.

2.1.2.3 Interaction dipolaire

Le couplage dipolaire est le couplage magnétique direct entre deux ou plusieurs spins à travers l'espace. L'interaction dipôle-dipôle peut prendre son origine de couplages dipolaires homonucléaires ou hétéronucléaires. Nous nous intéressons plus particulièrement au couplage dipolaire hétéronucléaire entre deux spins qui est à l'origine d'une série de techniques utilisées dans ce projet, telles que la polarisation croisée et l'expérience « *REDOR* ». L'Hamiltonien du couplage dipolaire prend la forme suivante:

$$\mathcal{H}_D = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar^2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1) I_z \cdot S_z \quad (2.16)$$

où γ_I et γ_S sont les rapports gyromagnétiques des deux noyaux couplés I et S , r^3 la distance séparant les noyaux I et S , θ l'angle formé entre le vecteur internucléaire et le champ magnétique externe B_0 , et I_z et S_z les opérateurs de spin nucléaire associés aux noyaux I et S . Le terme en $(3 \cos^2 \theta - 1)$ indique que le couplage dipolaire possède une dépendance orientationnelle par rapport au champ magnétique B_0 , et cette dépendance peut être

éliminée en faisant tourner l'échantillon à un angle de $54,7^\circ$ appelé l'angle magique. De plus, la dépendance en r^3 du couplage dipolaire indique que sa valeur est très sensible à la distance séparant les deux noyaux. Cette dépendance est d'ailleurs largement exploitée dans les expériences de RMN visant la mesure de distances internucléaires.

2.1.2.4 Interaction quadrupolaire (191, 194, 195)

Les noyaux de spin $I \geq 1$ sont appelés noyaux quadrupolaires. En plus de posséder un moment magnétique commun à tous les noyaux actifs en RMN, ils possèdent un moment quadrupolaire électrique eQ . Ce moment quadrupolaire électrique interagit avec des gradients de champ électrique (*EFG*) autour du noyau qui eux originent de la distribution de charge non symétrique des électrons et noyaux environnants. Cette interaction entre le moment quadrupolaire du noyau et les gradients de champ électrique *EFG* s'appelle l'interaction quadrupolaire. L'Hamiltonien \mathcal{H}_Q décrivant l'interaction entre le moment quadrupolaire eQ du noyau et le gradient de champ électrique *EFG* au noyau se représente comme suit:

$$\mathcal{H}_Q = \frac{eQ}{6I(2I-1)\hbar} \hat{I} \cdot V \cdot \hat{I} \quad (2.17)$$

où \hat{I} est l'opérateur moment angulaire, et V le tenseur *EFG*. Dans ce projet, nous nous intéressons au noyau deutérium ^2H qui possède un nombre de spin I de valeur égale à 1. Nous entrerons davantage en détail sur la RMN du deutérium à la section 2.2.2.

2.2 Étude de RMN des membranes lipidiques

La spectroscopie de RMN à l'état solide est très bien adaptée à l'étude des membranes lipidiques. Dans cette section, il sera question de la spectroscopie de RMN du

phosphore-31 pour l'étude des têtes polaires des lipides, et de la spectroscopie de RMN du deutérium pour l'étude des chaînes acyle des lipides composant les membranes lipidiques.

2.2.1 RMN du phosphore-31

2.2.1.1 Principes de base (190, 196, 197)

Les phospholipides composant les membranes lipidiques modèles utilisées dans cette étude contiennent un atome de phosphore d'abondance naturelle de 100% et de spin $\frac{1}{2}$ à leur tête polaire. Ceux-ci peuvent donc être étudiés sans marquage isotopique avec une très bonne sensibilité. En spectroscopie de RMN du phosphore-31 à l'état statique, les interactions dominantes donnant lieu à des spectres larges et mal résolus sont l'anisotropie de déplacement chimique (ADC) et le couplage dipolaire hétéronucléaire phosphore-proton (D_{P-H}). Le couplage dipolaire homonucléaire phosphore-phosphore (D_{P-P}) est également présent mais comme il est beaucoup plus faible que le couplage D_{P-H} , il peut être négligé. De plus, il est possible d'éliminer le couplage dipolaire D_{P-H} par une irradiation à haute puissance des protons appelée découplage. Les spectres ainsi obtenus sont le reflet de l'anisotropie de déplacement chimique pour le noyau phosphore-31. L'ADC est décrite par un tenseur dont les valeurs des principaux éléments σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} définissent la forme du spectre de poudre, tel qu'illustré à la Figure 2.3.

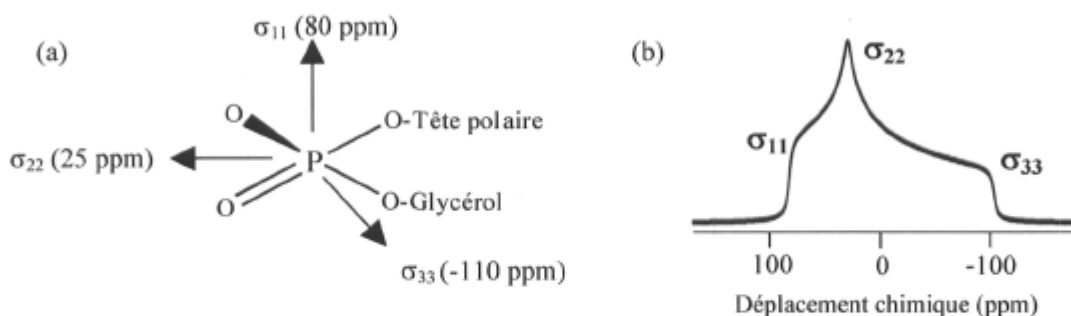


Figure 2.3: (a) Axes principaux du tenseur ADC par rapport au système d'axes principal (PAS) pour un atome de phosphore à la tête polaire des lipides. Les déplacements chimiques associés à chacun de ces éléments sont associés à un groupement phosphodiester statique. (b) Spectre de RMN ^{31}P de poudre d'un groupement phosphodiester statique.

Les membranes modèles étudiées dans ce projet sont en phase fluide. Elles sont donc animées de mouvements à symétrie axiale tels que les mouvements de rotation et d'oscillation. Ces mouvements se produisent autour d'un axe principal qui, pour les membranes lipidiques, se définit par la normale à la bicouche. Pour des systèmes en mouvement de rotation à symétrie axiale, les éléments $\sigma_{11}/\sigma_{22}/\sigma_{33}$ du tenseur initialement asymétrique peuvent s'exprimer en deux nouveaux éléments σ_{\parallel} et σ_{\perp} définissant un tenseur ADC à symétrie axiale et à partir duquel nous calculons la valeur isotrope σ_{iso} du tenseur ADC:

$$\sigma_{\parallel} = \sigma_{11} \quad (2.18)$$

$$\sigma_{\perp} = \frac{(\sigma_{22} + \sigma_{33})}{2} \quad (2.19)$$

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3}(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) = \frac{1}{3}(\sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp}) \quad (2.20)$$

où $\sigma_{//}$ et σ_{\perp} sont les composantes parallèle et perpendiculaire du tenseur ADC à symétrie axiale, et σ_{iso} la composante isotrope du tenseur ADC. La valeur de $\sigma_{//}$ est celle observée pour un lipide orienté parallèlement au champ magnétique B_0 , alors que la valeur de σ_{\perp} est celle observée pour un lipide orienté perpendiculairement au champ B_0 . Partant de ces deux équations, nous pouvons définir l'ADC d'un système à symétrie axiale, $\Delta\sigma$, de la manière suivante:

$$\Delta\sigma = \sigma_{//} - \sigma_{\perp} \quad (2.21)$$

Ainsi, plus un système comporte de mouvements de grande amplitude, plus il verra son ADC ou sa largeur spectrale $\Delta\sigma$ réduite. La dépendance orientationnelle du déplacement chimique par rapport au champ magnétique, ou anisotropie de déplacement chimique, est donnée par l'équation suivante:

$$\Delta\nu(\theta) = \frac{2}{3} \Delta\sigma \left(\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) \quad (2.22)$$

où $\Delta\nu$ est la fréquence réduite exprimée en ppm et θ l'angle entre le tenseur ADC du noyau et le champ magnétique B_0 . Cette expression nous indique que pour chaque orientation donnée du phospholipide par rapport au champ magnétique B_0 , nous observons une fréquence caractéristique de cette orientation.

Pour les dispersions lipidiques où les lipides adoptent une distribution d'orientation par rapport au champ magnétique B_0 , telles que les vésicules multilamellaires, le spectre de poudre obtenu par la RMN du phosphore-31 est une superposition de la multitude de fréquences observées pour chacune des orientations possibles des lipides. De plus, pour un système lipidique animé de mouvements à symétrie axiale, l'intensité observée pour chaque fréquence constituant le spectre de poudre est fonction du nombre de phospholipides contribuant à cette fréquence. La Figure 2.4 illustre l'effet des mouvements à symétrie

axiale sur l'ADC et sur la forme des spectres de poudre. Pour un groupement phosphodiester statique, le spectre de RMN ^{31}P présente trois discontinuités aux valeurs de σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} . Pour un système lipidique animé de mouvements de rotation à symétrie axiale, l'ADC $\Delta\sigma$ est définie par deux valeurs extrêmes σ_{\parallel} et σ_{\perp} comme indiqué à l'équation 2.21. Pour un système animé à la fois de mouvements de rotation et d'oscillation comme c'est le cas pour les lipides des membranes modèles en phase fluide, l'ADC est définie par des valeurs de σ_{\parallel} et σ_{\perp} plus petites appelées composantes parallèle et perpendiculaire du tenseur ADC réduit et notées σ'_{\parallel} et σ'_{\perp} .

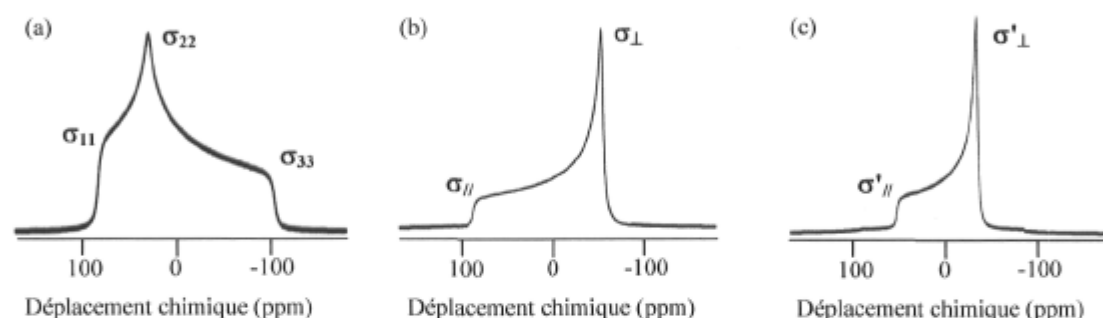


Figure 2.4: Spectres de RMN ^{31}P (a) d'un groupement phosphodiester statique où $\sigma_{11} \neq \sigma_{22} \neq \sigma_{33}$, (b) d'un groupement phosphodiester à symétrie axiale où $\sigma_{11} \neq \sigma_{22} = \sigma_{33}$ animé d'un mouvement de rotation, et (c) d'un groupement phosphodiester à symétrie axiale où $\sigma_{11} \neq \sigma_{22} = \sigma_{33}$ animé de mouvements d'oscillation et de rotation (197).

2.2.1.2 Spectres de RMN ^{31}P de systèmes lipidiques (197, 198)

Comme nous l'avons vu à la section précédente, la forme des spectres de RMN ^{31}P est sensible aux mouvements à la tête polaire des lipides. Outre les mouvements de rotation et d'oscillation, et compte tenu de la dépendance orientationnelle du déplacement chimique, les spectres sont également sensibles aux diverses organisations, phases et morphologies des membranes lipidiques. Dans ces arrangements, les lipides adoptent des orientations diverses par rapport au champ B_0 . Comme le déplacement chimique du noyau ^{31}P est

fonction de son orientation par rapport au champ B_0 , les spectres de RMN ^{31}P sont le reflet de ces arrangements. Dans ce projet, nous avons étudié trois types différents de membranes modèles, soient les vésicules multilamellaires, les bicouches orientées entre des plaques de verre avec la normale à la bicouche parallèle au champ B_0 et les bicelles. Des exemples de spectres de RMN ^{31}P pour chacun de ces systèmes de membranes modèles sont présentés à la Figure 2.5.

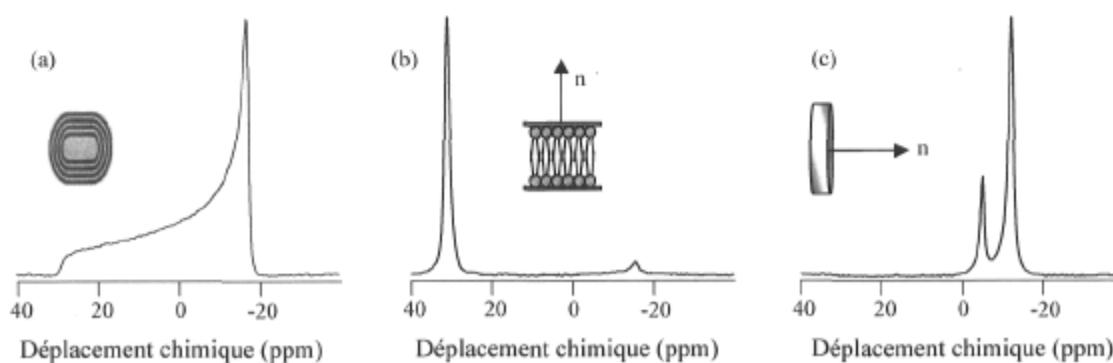


Figure 2.5: Spectres de RMN ^{31}P caractéristiques (a) de vésicules multilamellaires, (b) de bicouches orientées entre des plaques de verre avec la normale à la bicouche parallèle au champ B_0 et (c) de bicelles.

Dans le cas des vésicules multilamellaires où les lipides adoptent une distribution d'orientation dans le champ magnétique B_0 , la largeur spectrale $\Delta\sigma$ mesurée via les bornes $\sigma_{//}$ et σ_{\perp} nous renseigne sur la dynamique et/ou l'orientation de la tête polaire. Picard et coll. proposent d'analyser les variations dans la dynamique et/ou l'orientation des têtes polaires des lipides par le calcul d'un paramètre d'ordre appelé S_2 qui prend la forme suivante:

$$S_2 = \frac{\delta}{\delta_{ref}} \quad (2.23)$$

où δ et δ_{ref} sont les anisotropies de déplacement chimique du système lipidique modifié contenant le peptide, et du système de référence lipidique pur (199, 200). Le paramètre d'ordre S_2 est égal à 1 pour un système où la dynamique est la même que dans le système de référence, et est égal à 0 pour un système totalement isotrope. Toute valeur supérieure à 1 indique que l'ADC du système modifié est supérieure à l'ADC du système de référence, le système modifié étant par conséquent davantage stabilisé que le système de référence.

Pour les vésicules multilamellaires dont le déplacement chimique présente une dépendance orientationnelle par rapport au champ B_0 , la forme des spectres ^{31}P nous renseigne sur la distribution d'orientation des lipides. Cette distribution d'orientation est quantifiée par un paramètre d'ordre S_I proposé par Picard et coll. (199, 200) et qui se définit comme suit:

$$S_I = \frac{(M_1 - \delta_{iso})}{\delta} \quad (2.24)$$

où M_1 est le premier moment spectral qui relie la distribution d'intensité en fonction de chaque fréquence, et δ_{iso} et δ le déplacement chimique isotrope et l'ADC. Le paramètre d'ordre S_I peut varier de 1 à -0,5, selon que l'axe des lipides est soit parallèle ou perpendiculaire au champ B_0 . Ainsi, pour des vésicules allongées, c'est-à-dire de forme prolate où les lipides sont majoritairement perpendiculaires au champ B_0 , une valeur près de -0,5 est attendue. Pour des vésicules aplaties, c'est-à-dire de forme oblate où les lipides sont majoritairement parallèles au champ B_0 , une valeur près de 1 pourra être calculée. Des vésicules parfaitement sphériques afficheront quant à elles une valeur de S_I de 0.

Parallèlement aux phases lamellaires des bicouches lipidiques, les lipides peuvent prendre divers arrangements tels que les phases hexagonales normales et inverses, les phases cubiques et les phases micellaires. Ces phases peuvent être identifiées sur les spectres de RMN ^{31}P puisque chacune d'elles présente un patron spectral caractéristique à la fois de l'orientation et des mouvements des lipides, de même que des mouvements du

système lipidique entier (119, 197). Les lipides constituant les bicouches orientées entre des plaques de verre peuvent adopter une orientation parallèle ou perpendiculaire par rapport au champ B_0 . Ainsi, une résonance dont le déplacement chimique est fonction de l'angle θ est observée sur les spectres de RMN ^{31}P (voir Figure 2.5(b)). Pour ce qui est des bicelles, les déplacements chimiques des deux résonances observées à basse et haute fréquences sont associés aux lipides à courtes et longues chaînes. Pour ces deux types de membranes orientées, tout changement dans le déplacement chimique et dans l'asymétrie des résonances, ainsi que l'apparition de nouvelles composantes spectrales reflètent un changement de dynamique et/ou d'orientation de la tête polaire, ainsi qu'un changement dans l'organisation lipidique.

2.2.1.3 Séquence d'impulsions « Écho de Hahn » (201)

Les spectres de RMN ^{31}P sont obtenus par une séquence d'impulsions appelée « Écho de Hahn ». Cette séquence est illustrée à la Figure 2.6.

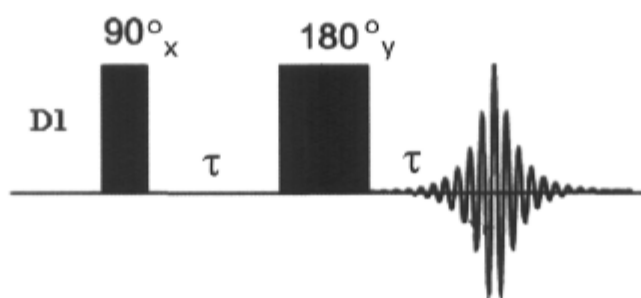


Figure 2.6: Séquence d'impulsions « Écho de Hahn » (202).

Après un délai d'équilibration D1, il y a une première impulsion de 90° sur l'axe x de longueur suffisante à faire basculer l'aimantation de sa position d'origine selon l'axe z à un alignement selon l'axe y . Cette séquence est employée pour corriger le déphasage des spins survenant dans le plan xy pendant un temps τ à la suite de la première impulsion de 90° . En effet, les processus de relaxation transversale définis précédemment conduisent à

une perte de cohérence des spins dans le plan xy et ainsi à une perte de signal de RMN détectable. Toutefois, par l'application d'une seconde impulsion de 180° sur l'axe y , il est possible de refocaliser les spins déphasés et ainsi donner lieu à un signal maximal observable après un temps τ .

2.2.2 RMN du deutérium

2.2.2.1 Principes de base (203, 204)

Parallèlement à la RMN du phosphore-31 qui étudie la tête polaire des lipides, la RMN du deutérium permet l'étude de la région hydrophobe des membranes modèles caractérisée par les chaînes acyle des lipides. Compte tenu de la faible abondance naturelle et du faible rapport gyromagnétique du noyau deutérium, nous avons recours à l'utilisation de lipides dont les protons constituant les groupements méthylène et méthyle des chaînes acyle ont été remplacés par des atomes de deutérium (^2H). Ce remplacement isotopique a l'avantage de ne pas perturber la conformation des chaînes acyle et de fournir un signal de RMN très peu contaminé par l'abondance naturelle de cet isotope provenant d'autres atomes ^2H du système.

De nombre de spin $I = 1$, le noyau ^2H possède trois états d'énergie différents. Ces états résultent de l'interaction Zeeman entre le noyau ^2H et le champ magnétique externe B_0 . De plus, l'interaction quadrupolaire dominante en RMN ^2H engendre des transitions possibles entre ces niveaux d'énergie, et donnent lieu à la présence d'un doublet centré à ν_0 , la fréquence de Larmor du noyau ^2H . Pour un système statique, le spectre de poudre obtenu est la superposition d'une série de doublets représentant toutes les orientations possibles des liens C-D par rapport au champ magnétique B_0 .

La dépendance orientationnelle du couplage quadrupolaire est donnée par l'équation suivante:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} [(3 \cos^2 \theta - 1) + (\eta \cos 2\phi \sin^2 \theta)] \quad (2.25)$$

où $\Delta\nu_Q$ est l'écart quadrupolaire en Hertz, $e^2 q Q/h$ la constante de couplage quadrupolaire de valeur approximative à 167 kHz pour un groupement CD_2 , θ et ϕ les angles définissant l'orientation du tenseur EFG par rapport au champ B_0 , et η le paramètre d'asymétrie du système (203). L'écart quadrupolaire $\Delta\nu_Q$ se définit comme la différence en fréquence entre deux résonances symétriques constituant un doublet. Dans le cas d'un système à symétrie axiale ($\eta = 0$) animé de mouvements de rotation et d'oscillation comme les phospholipides des membranes lipidiques en phase fluide, nous devons réécrire l'équation 2.25 de manière à tenir compte de ces mouvement, de tel sorte que:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{2} \left\langle \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right\rangle \left\langle \frac{3 \cos^2 \gamma - 1}{2} \right\rangle \quad (2.26)$$

où θ est l'angle entre la normale à la bicouche n et la direction du champ B_0 , β l'angle entre le lien C-D et l'axe de rotation du lipide n' , et γ l'angle entre l'axe de rotation du lipide et la normale à la bicouche, tel que représenté à la Figure 2.7. Les crochets indiquent une moyenne des angles β et γ dans le temps.

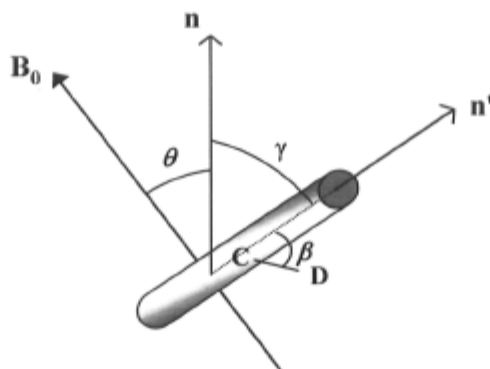


Figure 2.7: Angles θ , β et γ reliant le vecteur C-D au système d'axes du laboratoire.

Pour des membranes lipidiques en phase lamellaire fluide, l'écart quadrupolaire peut aussi être défini de la manière suivante:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{2} S_{CD} \quad (2.27)$$

où S_{CD} est un paramètre d'ordre orientationnel qui renseigne sur l'ordre des liens C-D des lipides, et θ l'angle entre la normale à la bicouche n et la direction du champ B_0 . La Figure 2.8 illustre l'effet des mouvements de rotation et d'oscillation sur l'écart quadrupolaire $\Delta\nu_Q$. Ainsi, plus les mouvements sont importants, plus l'écart quadrupolaire est faible.

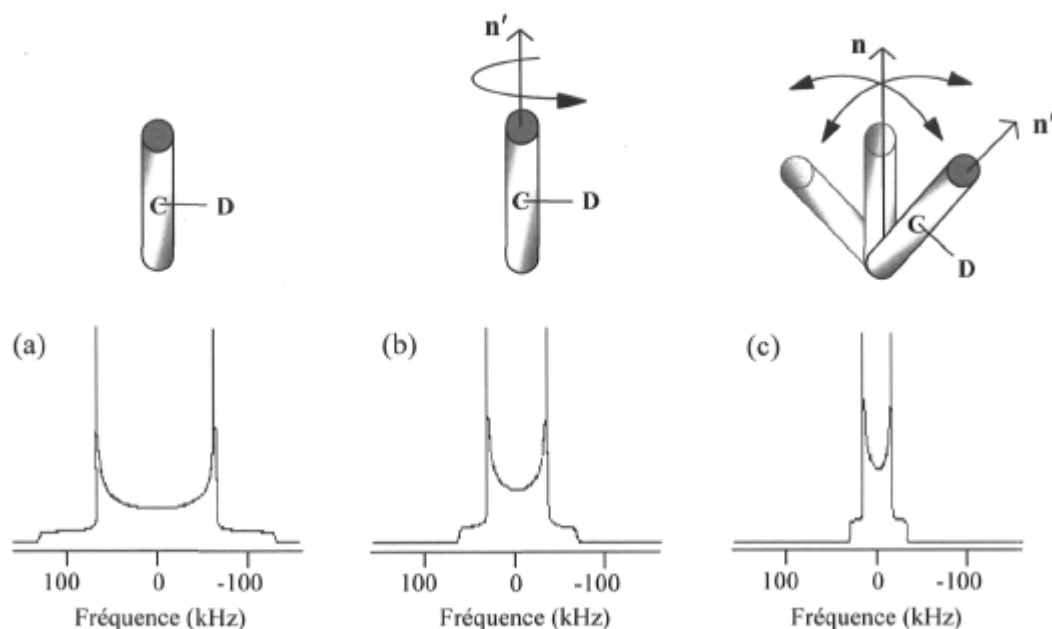


Figure 2.8: Effet des mouvements de rotation et d'oscillation sur l'allure des spectres de poudre en RMN ^2H : (a) Lipide statique, (b) Lipide animé d'un mouvement de rotation, et (c) Lipide animé de mouvements de rotation et d'oscillation.

Si nous prenons l'exemple du spectre illustré à la Figure 2.8(c), l'épaule de faible intensité à ± 30 kHz est associée aux lipides orientés parallèlement à la normale à la bicouche ($\theta = 0^\circ$), alors que les résonances les plus intenses à ± 15 kHz sont associées aux lipides orientés perpendiculairement à la normale à la bicouche ($\theta = 90^\circ$). Tout signal entre ces deux extrêmes correspond à des orientations intermédiaires entre 0° et 90° .

2.2.2.2 Spectres de RMN ^2H de systèmes lipidiques (205)

Les lipides utilisés dans les études par spectroscopie de RMN ^2H ont plusieurs deutérons positionnés tout le long des chaînes acyle. Dans le cas de systèmes lipidiques en phase fluide, chaque écart quadrupolaire est associé aux positions des deutérons sur la chaîne acyle. Ainsi, un groupement CD_2 en début de chaîne présente un écart quadrupolaire maximal compte tenu des mouvements moléculaires restreints dans cette région de la

chaîne appelée région plateau. Pour un groupement CD_3 en bout de chaîne où l'amplitude des mouvements est maximale, l'écart quadrupolaire observé sera minimal, et cette région de la chaîne est appelée région terminale. Un exemple de spectre de RMN ^2H pour des vésicules multilamellaires en phase fluide est donné à la Figure 2.9(a).

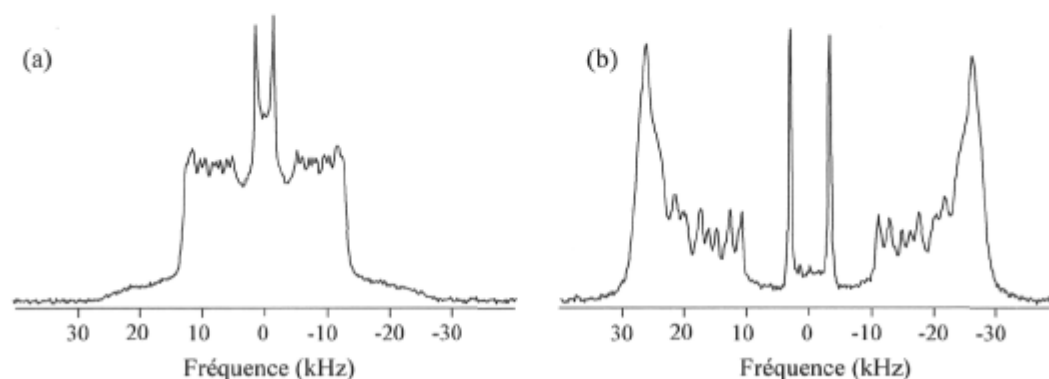


Figure 2.9: Spectres de RMN ^2H (a) de vésicules multilamellaires et (b) de bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre avec la normale à la bicouche parallèle au champ B_0 . Les écarts $\Delta\nu_Q$ maximal et minimal correspondent aux groupements CD_2 à la région plateau et aux groupements CD_3 à la région terminale.

Dans le cas de bicouches orientées entre des plaques de verre ou de bicelles dopées aux lanthanides dont la normale à la bicouche est parallèle au champ B_0 , la valeur de l'écart quadrupolaire pour chaque deutéron de la chaîne acyle est le double de celle observée pour un système non orienté, tel qu'illustré à la Figure 2.9(b). Ceci provient de la dépendance orientationnelle de l'écart quadrupolaire comme décrit aux équations 2.26 et 2.27. Ainsi, une analyse de l'écart quadrupolaire des systèmes lipidiques nous renseigne sur l'ordre orientationnel des chaînes acyle, et à partir de l'écart quadrupolaire nous pouvons calculer le paramètre d'ordre S_{CD} . De manière similaire à la RMN ^{31}P , la forme du spectre de RMN ^2H ainsi que l'apparition de nouvelles composantes spectrales sont un indice de la présence de nouvelles structures et de nouveaux arrangements lipidiques.

2.2.2.3 Séquence d'impulsions « Écho quadrupolaire » (195, 206)

Lorsque nous procédons à la transformée de Fourier d'un signal de précession libre (FID) pour en obtenir le spectre, il est important de débiter l'acquisition du signal FID rapidement après les impulsions pour ainsi obtenir le maximum du signal FID. Nous devons toutefois garder un certain délai entre les impulsions et l'acquisition du signal pour éviter les réflexions d'impulsions contaminant le signal FID. Pour un signal qui décroît relativement lentement, ce délai est considéré insignifiant en comparaison du temps total d'acquisition, et les effets des réflexions sur les spectres sont minimes. Cependant, dans le cas d'un signal FID qui décroît très rapidement comme celui obtenu de noyaux ^2H , ce délai peut devenir problématique sur le temps total d'acquisition du signal FID. La séquence d'impulsions communément utilisée en RMN ^2H est la séquence de type « Écho quadrupolaire ». Cette séquence corrige les effets du délai, refocalise uniquement le couplage quadrupolaire de premier ordre et permet de faire la transformée de Fourier au tout début du FID. La refocalisation sélective s'effectue via la seconde impulsion ($90^\circ_{\pm y}$) déphasée de 90° par rapport à la première impulsion (90°_x). Cette deuxième impulsion est différente de l'impulsion de 180°_x retrouvée dans la séquence « Écho de Hahn » et qui inverse et refocalise toutes les interactions de spins nucléaires et champs magnétiques locaux.

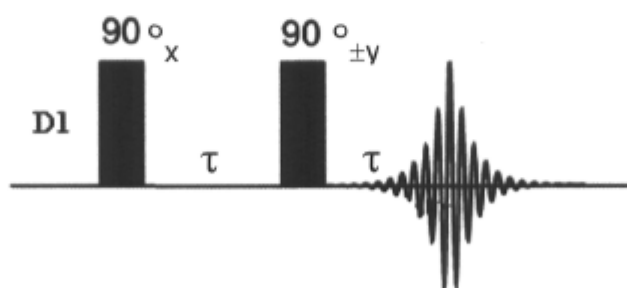


Figure 2.10: Séquence d'impulsions « Écho quadrupolaire » (202).

2.3 Étude de RMN des peptides

Parallèlement à l'étude des membranes lipidiques modèles par la RMN du phosphore-31 et du deutérium, nous nous sommes concentrés sur l'étude des peptides 14- et 21-mères en interaction avec ces membranes. Pour réaliser ces expériences, nous avons eu recours à la synthèse de séries de peptides dont certains acides aminés étaient enrichis des isotopes azote-15 et carbone-13. Les contraintes structurales telles que les contraintes orientationnelles, de distance, et d'angles de torsion sont largement utilisées pour élucider la structure tridimensionnelle de peptides et protéines (133).

Dans un premier temps, il sera question de contraintes orientationnelles qui nous ont permis de déterminer la topologie membranaire des peptides 14- et 21-mères par la RMN de l'azote-15. Dans un deuxième temps, les contraintes de distances hétéronucléaires intermoléculaires ont permis de confirmer la proximité du peptide 14-mère avec les têtes polaires des lipides. Finalement, par la RMN du carbone-13, nous avons étudié la dynamique membranaire du peptide 21-mère via l'analyse des bandes de rotation obtenues par la technique de rotation à l'angle magique. La Figure 2.11 présente les séries de peptides 14- et 21-mères ainsi que les acides aminés sélectivement marqués à l'azote-15 et au carbone-13.

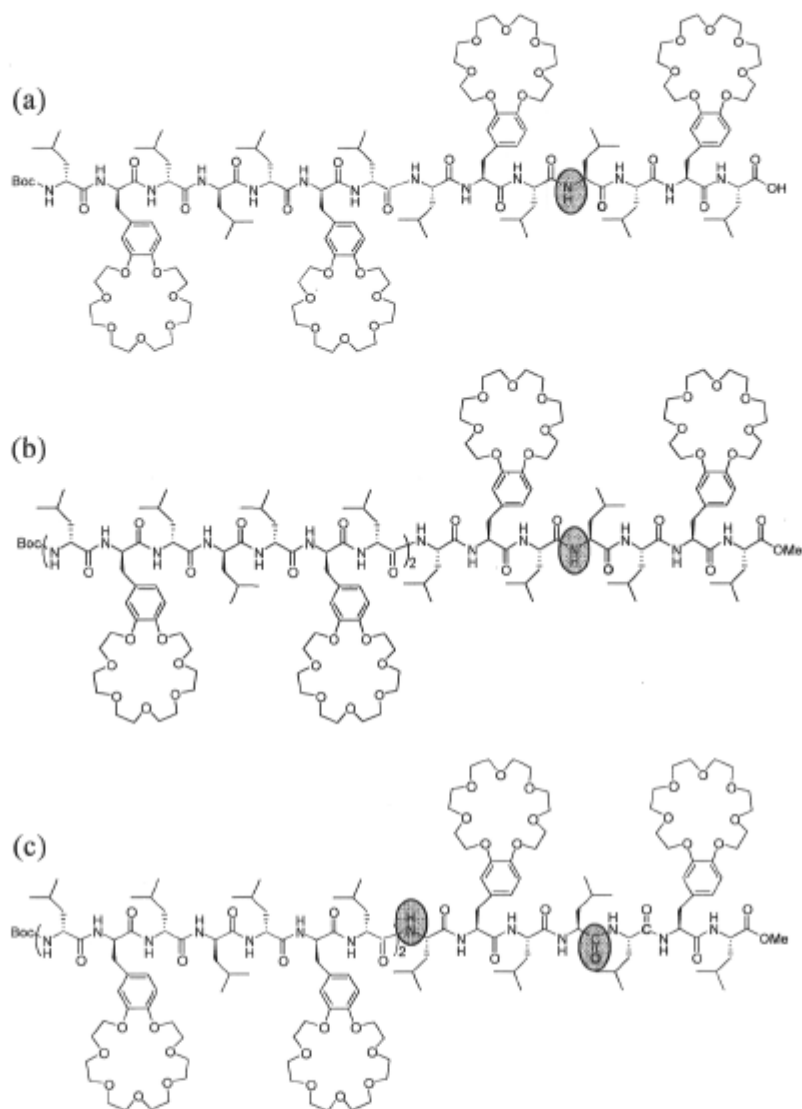


Figure 2.11: Structures des peptides (a) 14-mère et (b) 21-mère marqués sélectivement à l'azote-15 sur le résidu leucine en position 11 et 18; (c) Structure du peptide 21-mère doublement marqué sélectivement à l'azote-15/carbone-13 sur les résidus leucine en position 15/18.

2.3.1 Contraintes orientationnelles (133, 207)

L'étude des contraintes orientationnelles s'effectue sur des échantillons possédant une orientation uniaxiale par rapport au champ magnétique B_0 . Ces contraintes s'obtiennent par l'observation de plusieurs interactions de spins nucléaires anisotropes telles que le déplacement chimique, et les couplages dipolaire et quadrupolaire. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à la topologie membranaire des peptides 14- et 21-mères obtenue par la spectroscopie de RMN de l'azote-15. Les peptides sélectivement marqués à l'azote-15 ont été incorporés à des bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre (208). Les données obtenues de ces études nous renseignent sur l'orientation d'un site moléculaire spécifique, en l'occurrence le tenseur ADC du noyau ^{15}N d'un résidu leucine, par rapport à l'axe d'alignement du système membranaire.

2.3.1.1 RMN de l'azote-15 (130-132, 209)

La précision dans la détermination de l'orientation membranaire des peptides est dépendante à la fois de la qualité d'alignement des membranes modèles, et de la connaissance des paramètres du tenseur ADC, soient les valeurs des principaux éléments du tenseur ADC et son orientation par rapport au système d'axe moléculaire. Les valeurs des éléments du tenseur ADC sont aisément obtenues par l'analyse du spectre de poudre pour un échantillon donné. L'orientation du tenseur ADC est déterminée par l'étude de monocristaux de composés modèles. La Figure 2.12 illustre la magnitude et l'orientation des éléments du tenseur ADC pour le noyau ^{15}N par rapport au système d'axe moléculaire d'un acide aminé. L'élément σ_{33} forme un angle de 17° par rapport au lien N-H, l'élément σ_{11} est dévié du plan peptidique d'environ 20° , et l'élément σ_{22} est perpendiculaire au plan défini par les éléments σ_{11} et σ_{33} (131).

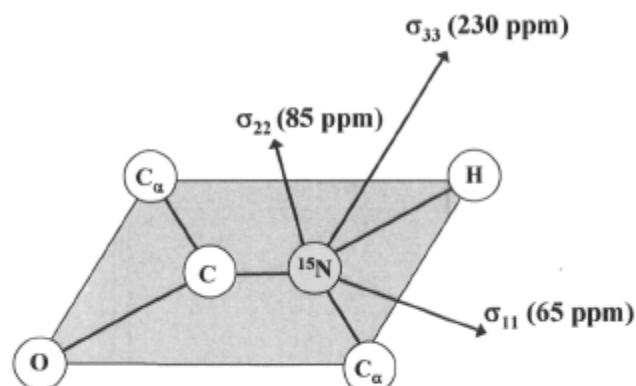


Figure 2.12: Orientation des principaux axes du tenseur ADC ^{15}N d'un groupement amide d'un acide aminé et valeurs moyennes des éléments σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} (131).

Pour les peptides hélicoïdaux, le lien N-H est orienté parallèlement à l'axe longitudinal de l'hélice, et l'élément σ_{33} est aligné quasi parallèlement au lien N-H. Ainsi, de par la magnitude et l'orientation de l'élément σ_{33} du tenseur ADC, nous pouvons corrélérer l'orientation membranaire d'un peptide hélicoïdal avec le déplacement chimique obtenu pour l'élément σ_{33} , tel qu'illustré à la Figure 2.13. Pour un peptide orienté parallèlement ou perpendiculairement au champ B_0 , des déplacements chimiques supérieurs à 200 ppm ou inférieurs à 100 ppm sont attendus. De plus, dans les membranes en phase fluide, les peptides peuvent être animés de mouvements de rotation autour de la normale à la bicouche. Moyennant partiellement l'ADC, ces mouvements peuvent donner lieu à des déplacements chimiques différents de ceux observés aux limites extrêmes du spectre de poudre. Comme la précision dans la détermination de l'orientation membranaire des peptides est fonction de la qualité d'alignement des membranes, des défauts dans l'organisation structurale en bicouches sont susceptibles d'engendrer une distribution d'orientation des peptides par rapport au champ B_0 . Il est donc primordial de s'assurer de la qualité de l'alignement des bicouches avant d'entreprendre les mesures d'orientation membranaire. Cette vérification s'effectue par la RMN ^{31}P ou ^2H où les lipides alignés parallèlement au champ B_0 auront une résonance à un déplacement chimique ^{31}P près de 30 ppm ou un écart quadrupolaire maximal près de 50 kHz pour les groupements CD_2 de la région plateau.

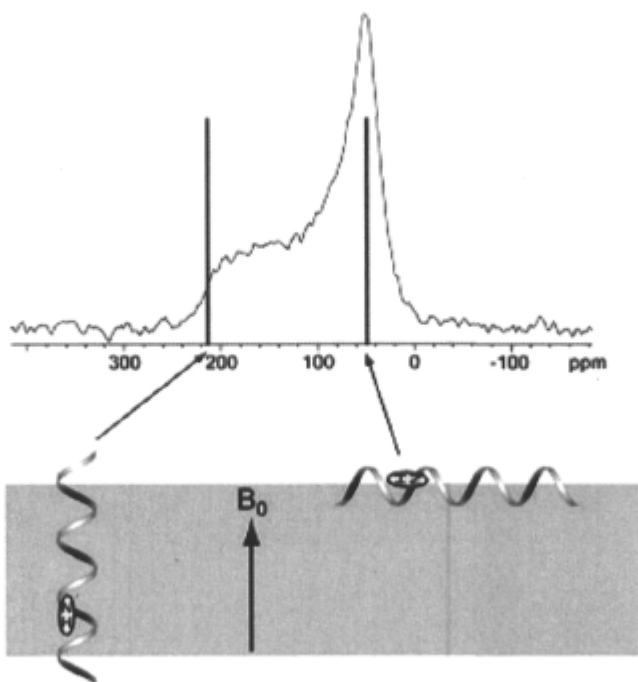


Figure 2.13: Schéma illustrant la dépendance orientationnelle du déplacement chimique de l'élément σ_{33} du tenseur ADC du noyau ^{15}N par rapport au champ B_0 (202).

La spectroscopie de RMN de l'azote-15 peut également être employée pour étudier la diffusion rotationnelle de peptides incorporés à des bicouches lipidiques dont la normale est orientée perpendiculairement au champ magnétique B_0 (210-212). En ce sens, les bicelles et bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre et dont la normale est perpendiculaire au champ B_0 sont employées. En interaction avec les membranes lipidiques en phase fluide, les peptides sont très souvent animés de mouvements de vibration et d'oscillation, et ces mouvements sont susceptibles d'engendrer de légers changements conformationnels. En combinaison à ces mouvements moléculaires internes, les peptides peuvent tourner autour de la normale à la bicouche. La Figure 2.14 illustre la diffusion rotationnelle pour un peptide incorporé à une bicouche lipidique dont la normale est orientée parallèlement et perpendiculairement au champ magnétique B_0 .

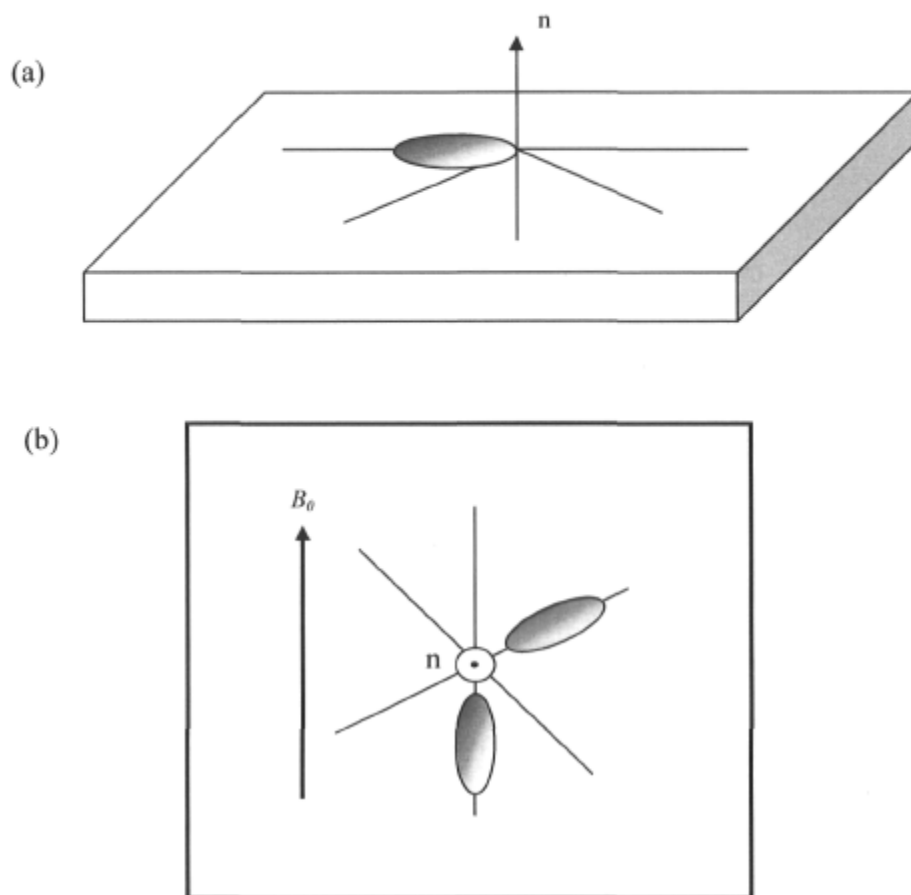


Figure 2.14: Schéma illustrant la diffusion rotationnelle d'un peptide incorporé à une bicouche lipidique dont la normale est orientée (a) parallèlement et (b) perpendiculairement au champ magnétique B_0 .

Tel que démontré à la Figure 2.14(a), la diffusion rotationnelle ne change pas l'orientation du lien amide des peptides. Ainsi, l'allure des spectres en RMN ^{15}N sera la même qu'il y ait diffusion rotationnelle ou non. Cependant, dans le cas de la Figure 2.14(b), la diffusion rotationnelle crée une distribution circulaire d'orientation par rapport à la direction du champ magnétique. La forme des spectres de RMN obtenus pour ces systèmes sera donc différente selon que le peptide est statique ou qu'il diffuse de façon rotationnelle autour de la normale à la bicouche. De plus, l'allure des spectres de RMN ^{15}N est sensible à la vitesse de diffusion rotationnelle.

2.3.1.2 Polarisation croisée (196, 213)

Compte tenu du faible rapport gyromagnétique du noyau ^{15}N et malgré le fait que les peptides soient spécifiquement marqués de cet isotope, nous avons recours à une séquence d'impulsions faisant intervenir le principe de la polarisation croisée. Cette séquence d'impulsions est illustrée à la Figure 2.15 ci-contre.

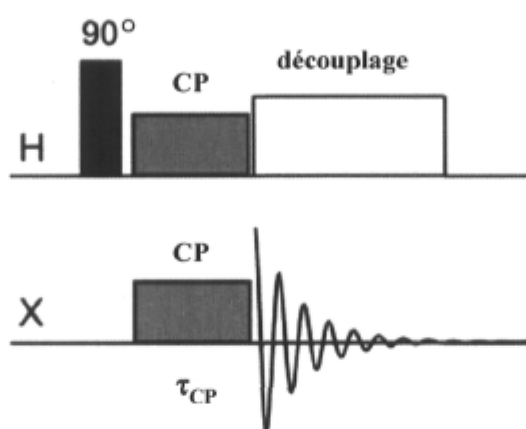


Figure 2.15: Séquence d'impulsions avec polarisation croisée. Le canal X est associé au noyau détecté (202).

La polarisation croisée augmente la sensibilité d'un noyau de faible rapport gyromagnétique, tel que le noyau azote-15, par transfert d'aimantation de noyaux à haut rapport gyromagnétique, tel que les noyaux proton. Dans la séquence d'impulsions de la Figure 2.15, les noyaux ^1H sont excités par une impulsion de 90° . Ensuite, il y a une période τ_{CP} appelée temps de contact pendant laquelle il y a transfert de polarisation des noyaux ^1H aux noyaux ^{15}N . Les fréquences de précession des noyaux ^1H et ^{15}N dans leur référentiel tournant respectif sont données par:

$$\omega_H = \gamma_H \cdot B_H \quad (2.28)$$

$$\omega_N = \gamma_N \cdot B_N \quad (2.29)$$

où ω_H et ω_N sont les fréquences de précession des noyaux ^1H et ^{15}N , γ_H et γ_N les rapports gyromagnétiques respectifs des noyaux ^1H et ^{15}N , et B_H et B_N les champs de radiofréquences excitant les noyaux ^1H et ^{15}N . La condition essentielle à un transfert d'aimantation efficace est appelée la condition de Hartmann-Hahn et elle se définit comme suit:

$$\gamma_H B_H = \gamma_N B_N \quad (2.30)$$

C'est en ajustant expérimentalement les champs de radiofréquences B_H et B_N qu'il est possible de satisfaire cette condition essentielle à la réussite d'une expérience en polarisation croisée. En plus d'augmenter la sensibilité des noyaux à faible rapport gyromagnétique, la polarisation croisée permet l'acquisition plus rapide des spectres. En effet, comme la source de polarisation provient des protons, la vitesse d'acquisition est dictée par la relaxation longitudinale T_1 plus courte de ceux-ci comparativement aux temps T_1 plus longs des noyaux ^{15}N . Toutefois, comme le transfert de polarisation se fait par l'intermédiaire du couplage dipolaire $^1\text{H}/^{15}\text{N}$, tout phénomène réduisant le couplage dipolaire, tels que les mouvements moléculaires de grande amplitude et les vitesses MAS de module similaire, peuvent interférer avec la condition de Hartmann-Hahn et ainsi réduire l'efficacité de la polarisation croisée.

2.3.2 Contraintes de distances internucléaires

Les contraintes de distances internucléaires s'obtiennent à partir du couplage dipolaire entre deux noyaux sur des échantillons non orientés soumis à la rotation à l'angle magique. En marquant de manière sélective les peptides, il est possible d'obtenir des contraintes de distance entre des noyaux homonucléaires, tels que le couple de noyaux $^{13}\text{CO}/^{13}\text{C}_\alpha$, ou entre des noyaux hétéronucléaires, tels que les couples de noyaux $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ et $^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$. Dans ce projet, nous avons procédé à la détermination de distances hétéronucléaires intermoléculaires entre les noyaux ^{15}N des peptides 14-mères et les noyaux ^{31}P des têtes polaires des phospholipides. Dans cette section, nous illustrerons le

principe de la technique de mesure de distances hétéronucléaires « REDOR » en utilisant le couple de noyaux $^{15}\text{N}/^{13}\text{CO}$.

2.3.2.1 Rotation à l'angle magique (MAS) (214-216)

Afin d'obtenir des spectres haute résolution permettant une mesure précise des distances internucléaires, nous avons recours à la technique de rotation à l'angle magique. En faisant tourner le rotor à un angle de $54,7^\circ$ par rapport au champ B_0 , les interactions de spins nucléaires possédant une dépendance orientationnelle en $(3\cos^2\theta-1)$ par rapport au champ B_0 sont moyennées. Nous obtenons ainsi des spectres haute résolution avec des résonances au déplacement chimique isotrope. Toutefois, comme la rotation à l'angle magique moyenne de manière non sélective les interactions anisotropes, le couplage dipolaire hétéronucléaire essentiel à la mesure de la distance internucléaire $^{15}\text{N}/^{13}\text{CO}$ est également moyenné. La dépendance du couplage dipolaire pour la distance internucléaire est illustrée à l'équation 2.31 ci-contre:

$$D_{NC}(\text{Hz}) = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_N \gamma_C \hbar}{r^3} \right) \quad (2.31)$$

où D_{NC} est le couplage dipolaire en Hertz entre les noyaux ^{15}N et ^{13}CO , μ_0 la permittivité du vide dont la valeur est égale à $4\pi \times 10^{-7} \text{T}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^3$, et r la distance hétéronucléaire. La valeur du couplage dipolaire D_{NC} est fonction à la fois des rapports gyromagnétiques γ_N et γ_C des noyaux ^{15}N et ^{13}CO , et est inversement proportionnelle à la distance au cube entre les deux noyaux. Pour mesurer la distance entre deux noyaux spécifiques donnés tels que les noyaux ^{15}N et ^{13}CO , nous devons donc réintroduire de manière sélective le couplage dipolaire entre ceux-ci.

2.3.2.2 Technique « Rotational-Echo Double Resonance » (217-220)

Les diverses techniques employées à la réintroduction du couplage dipolaire interfèrent avec le processus de « moyennisation » de la rotation à l'angle magique. Dans le cas du couplage dipolaire hétéronucléaire, c'est par l'application d'impulsions synchronisées avec la période du rotor qu'il y a réintroduction du couplage. Tel que démontré à la Figure 2.16, sous les conditions de rotation à l'angle magique, il y a modulation temporelle du couplage dipolaire ω_D , et il en résulte une valeur de couplage dipolaire moyenne nulle après chaque période de rotor. Toutefois, lorsque des impulsions de radiofréquences sont appliquées à chaque demi-période de rotor, il en résulte un couplage dipolaire moyen non nul.

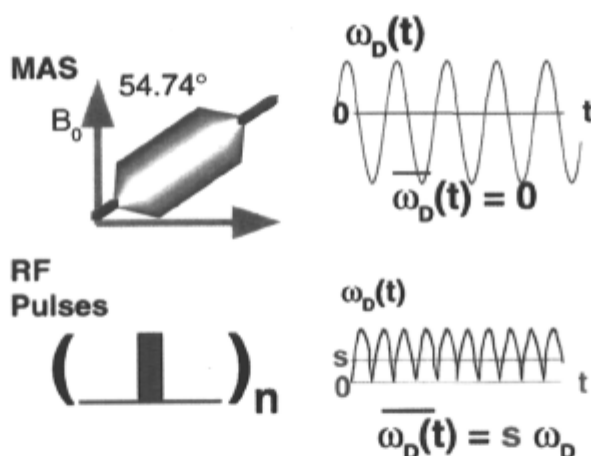


Figure 2.16: Réintroduction du couplage dipolaire hétéronucléaire sous les conditions de rotation à l'angle magique par l'application d'impulsions de radiofréquences synchronisées avec la période du rotor (218).

Dans la technique « REDOR » (*Rotational-Echo Double Resonance*), il existe plusieurs types de séquences d'impulsions permettant la réintroduction du couplage dipolaire hétéronucléaire. Dans ce projet, nous avons utilisé la séquence d'impulsions

« *REDOR* » de type « *XY-8* » pour réintroduire le couplage dipolaire hétéronucléaire entre les noyaux $^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$. Cette séquence est illustrée à la Figure 2.17.

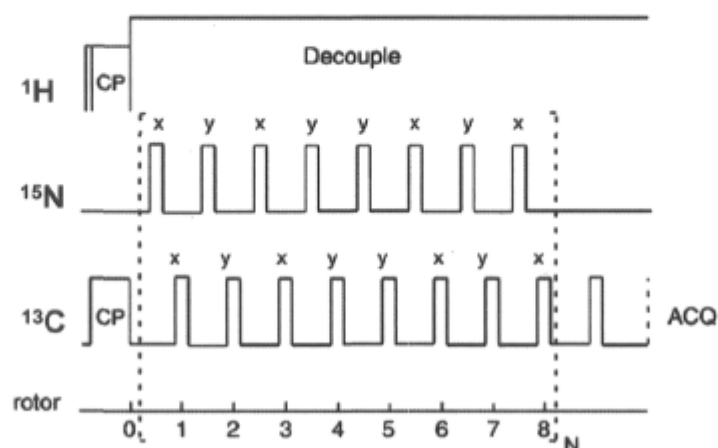


Figure 2.17: Séquence d'impulsions « *REDOR XY-8* » (221).

La mesure d'une distance hétéronucléaire par la technique « *REDOR* » nécessite l'acquisition de deux spectres. Le premier spectre est enregistré sans qu'il y ait réintroduction du couplage dipolaire entre les noyaux $^{15}\text{N}/^{13}\text{CO}$ et il se dénote S_0 . Tel qu'illustré à la séquence d'impulsions de la Figure 2.17, après le transfert de polarisation entre les noyaux ^1H et ^{13}C , il s'ensuit un train d'impulsions de 180° de type « *Echo* » sur le canal ^{13}C avant l'acquisition. Ces impulsions consécutives de phase inversée ont pour effet de corriger les imperfections de phase et de durée dans les impulsions. L'enregistrement du spectre non déphasé S_0 est également essentiel pour corriger les phénomènes de relaxation survenant pendant le train d'impulsions et menant à une diminution de l'intensité de la raie. Le deuxième spectre est quant à lui enregistré avec le train d'impulsions appliqué aux demi-périodes de rotor sur le canal indirect ^{15}N . Sur les spectres, la réintroduction du couplage dipolaire se manifeste par une diminution d'intensité de la résonance pour le noyau ^{13}C détecté. Ce deuxième spectre s'appelle spectre déphasé et il se dénote S . L'acquisition du couple de spectres S et S_0 se fait pour divers temps de déphasage pendant lequel le couplage dipolaire est réintroduit. La longueur du temps de déphasage est

déterminée à la fois par la vitesse de rotation du rotor et par le nombre d'impulsions appliquées avant qu'il y ait l'acquisition du spectre. La différence de déphasage ΔS pour les spectres S et S_0 se calcule comme suit:

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \quad (2.32)$$

où S_0 et S sont les intensités des résonances du groupement ^{13}CO pour les spectres sans et avec la réintroduction du couplage dipolaire. Ainsi, plus le déphasage du spectre S est important, plus le couplage dipolaire est fort, et plus la distance séparant les deux noyaux est faible. À la fin d'une expérience « *REDOR* », nous nous retrouvons avec une série de signaux déphasés $\Delta S/S_0$ dont la valeur est fonction d'un paramètre sans dimension λ défini à l'équation 2.33 ci-dessous:

$$\lambda = N_c T_r D_{NC} \quad (2.33)$$

où N_c est le nombre de cycles de rotor, T_r la période du rotor en seconde, et D_{NC} la valeur du couplage dipolaire en Hertz pour les noyaux ^{15}N et ^{13}CO . La dépendance du ratio $\Delta S/S_0$ sur le paramètre λ est illustrée à la Figure 2.18.

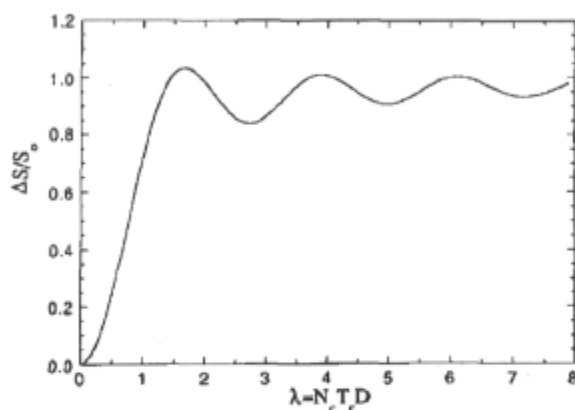


Figure 2.18: Courbe de déphasage universelle théorique « *REDOR* » illustrant la dépendance du signal déphasé $\Delta S/S_0$ en fonction du paramètre sans dimension λ (219).

La valeur du couplage dipolaire est extraite des spectres déphasés en ajustant la courbe de déphasage théorique « *REDOR* » aux valeurs expérimentales de $\Delta S/S_0$ (222). Une fois la valeur du couplage dipolaire connue, nous calculons la distance hétéronucléaire r suivant l'équation 2.34 ci-contre:

$$r = \sqrt[3]{\frac{\mu_0 \gamma_C \gamma_N \hbar}{2\pi D_{NC}}} \quad (2.34)$$

2.3.2.3 Conditions expérimentales (220)

Les expériences « *REDOR* » requièrent une correction pour l'abondance naturelle des signaux de même nature que les signaux détectés. Cette correction est d'autant plus importante si la valeur du couplage dipolaire attendue est faible. Il est donc primordial d'enregistrer les spectres « *REDOR* » du système lipides/peptides en abondance naturelle dans des conditions identiques à ceux enregistrés pour le système lipides/peptides enrichi des isotopes ^{13}C et ^{15}N . Les spectres « *REDOR* » du système en abondance naturelle sont ensuite soustraits des spectres « *REDOR* » du système enrichi et ce, pour un même temps de déphasage.

Une autre condition expérimentale importante est la température à laquelle les spectres « *REDOR* » sont enregistrés. En effet, les systèmes biologiques, qu'ils soient naturels ou modèles, sont très dynamiques. Ainsi, des mouvements intramoléculaires dont l'échelle de temps est de l'ordre de la fréquence du couplage dipolaire et de la fréquence MAS peuvent grandement interférer sur la précision de la mesure de la distance, voir la rendre impossible. C'est pourquoi ces expériences doivent s'effectuer sur des échantillons gelés dans un domaine de température variant de -10°C à -50°C . Cette diminution de température a pour effet de réduire au maximum les mouvements moléculaires nuisibles à la polarisation croisée et à la réintroduction efficace du couplage dipolaire.

2.3.3 Dynamique membranaire

Nous avons vu précédemment que pour des échantillons statiques, l'anisotropie de déplacement chimique possède une dépendance orientationnelle par rapport au champ B_0 . Cette dépendance orientationnelle peut être éliminée par la rotation à l'angle magique à condition que la vitesse de rotation soit supérieure à la grandeur de l'interaction anisotrope (215). Toutefois, si la vitesse de rotation de l'échantillon est relativement faible comparativement à la grandeur de l'interaction, celle-ci ne sera que partiellement moyennée et il sera possible d'extraire l'information anisotrope désirée tout en conservant des résonances bien résolues par la MAS. Dans cette section, nous nous intéressons plus particulièrement à la dynamique membranaire du peptide 21-mère sélectivement marqué au carbone-13 sur le résidu leucine 18, et en interaction avec des membranes modèles.

2.3.3.1 RMN du carbone-13 (193, 223)

L'information sur la dynamique membranaire des peptides peut s'obtenir à partir de l'analyse de l'ADC pour le groupement carbonyle ^{13}CO des résidus leucine. Pour un groupement carbonyle purement statique, l'ADC est d'environ 150 ppm. À très basse vitesse MAS, l'enveloppe spectrale de l'ADC est conservée. Le spectre se compose alors d'une résonance centrale au déplacement chimique isotrope δ_{iso} et de bandes de rotation de part et d'autre de cette résonance isotrope. Chacune des raies constituant l'enveloppe de l'ADC sont également espacées les unes des autres d'une valeur égale à la vitesse MAS en Hertz. Plus la vitesse de rotation de l'échantillon augmente, plus l'intensité se concentre sous la résonance isotrope et plus le nombre de bandes de rotation diminue.

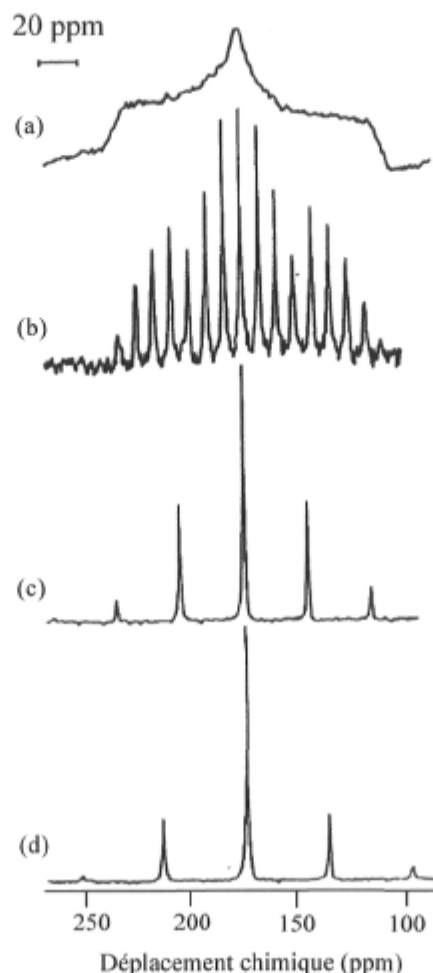


Figure 2.19: Spectres de RMN ^{13}C (50,3 MHz) obtenus pour le groupement carbonyle de la glycine à l'état solide: (a) Statique, (b) À une vitesse MAS de 0,5 kHz, (c) 1,6 kHz, et (d) 2,1 kHz (193).

La Figure 2.19 illustre l'effet de la vitesse MAS sur l'allure des spectres de RMN ^{13}C pour le groupement carbonyle de l'acide aminé glycine à l'état solide. Comme le nombre et l'intensité des bandes de rotation varient avec la forme du tenseur ADC, et que la forme du tenseur est sensible à la dynamique moléculaire, il est donc possible d'extraire de l'information sur la dynamique membranaire du peptide via une analyse du nombre et de l'intensité des bandes de rotation (224). Ainsi, plus un peptide est immobilisé par son interaction avec la membrane, plus le nombre et l'intensité des bandes de rotation sont importants, reflétant davantage la forme du tenseur ADC pour un groupement carbonyle

statique. À l'inverse, plus le peptide est mobile, plus le nombre et l'intensité des bandes de rotation sont faibles.

2.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique spectroscopique très polyvalente dont l'information recueillie est complémentaire à celle obtenue en spectroscopie de RMN. La spectroscopie IR-TF mesure des transitions d'énergie entre les niveaux vibrationnels pour divers liens chimiques des molécules à la suite de l'absorption de la radiation infrarouge. La région infrarouge complète du spectre électromagnétique couvre un domaine de longueurs d'onde allant de 1 à 1000 μm (225). La région qui nous intéresse et qui est très riche en information structurale est la région du moyen infrarouge située entre 0,25 et 2,5 μm (ou entre 4000 et 400 cm^{-1}) (226). Les divers mouvements vibrationnels étudiés sont la déformation et l'élongation des liaisons chimiques à l'intérieur des molécules. Ces mouvements induisent des variations du moment dipolaire et ils ont une échelle de temps très courte, soit de l'ordre de 10^{-13} seconde (227).

Les avantages de la spectroscopie IR-TF sont très nombreux et en font un des outils spectroscopiques par excellence pour l'étude des systèmes biologiques tels que les membranes lipidiques en interaction avec des protéines ou peptides (228). En effet, la spectroscopie IR-TF permet l'étude simultanée de la conformation des lipides et de la structure des peptides, et de plusieurs groupements fonctionnels sur une même molécule. De plus, les études conformationnelles et structurales par IR-TF se font sans l'introduction d'une sonde moléculaire pouvant perturber le système. Les quantités d'échantillons requises sont faibles et de l'ordre de 0,1 à 1,0 mg de solide, de 10 à 50 μl de solution, et de 1 à 5 % par poids pour une suspension (228). Les échantillons peuvent également être étudiés sous diverses formes, que ce soit sous forme solide ou de film, ou en suspension aqueuse. Cependant, l'un des principaux désavantages de la spectroscopie IR-TF pour l'étude des systèmes biologiques, naturels ou modèles, est la présence d'eau qui est un très

puissant absorbant en infrarouge (228). Cette limitation peut toutefois être contournée par l'emploi d'eau deutérée (D_2O) dont les principales bandes d'absorption ($2450-2540\text{ cm}^{-1}$ et $1215-1555\text{ cm}^{-1}$) sont en dehors du domaine infrarouge utile aux études conformationnelles et structurales. Nous verrons maintenant comment l'emploi de la spectroscopie IR-TF a été utile aux fins de cette thèse en permettant une étude de la région interfaciale des membranes lipidiques en interaction avec les peptides 14- et 21-mères.

2.4.1 Étude par IR-TF des systèmes biologiques

La spectroscopie IR-TF permet l'étude simultanée des divers constituants du système lipides/peptides via l'analyse des fréquences infrarouge spécifiques aux groupements de chacun des constituants. Le tableau 2.2 dresse une liste des principaux groupements pouvant être étudiés par spectroscopie IR-TF.

Tableau 2.2: Fréquences infrarouge (cm^{-1}) spécifiques aux divers groupements fonctionnels retrouvés dans les lipides et les peptides: ν_{as} et ν_s pour les mouvements d'élongation antisymétrique et symétrique, ν pour les mouvements d'élongation, ib pour les mouvements de déformation dans le plan, et d pour les mouvements de déformation (228, 229).

		Groupements fonctionnels	Fréquences (cm^{-1})
Lipide	Tête polaire	$\nu_{as}(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$	3038
	choline	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	1228
	Région interfaciale	$\nu(\text{CO})$	1735
	Région	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2920
	hydrophobe	$\nu_s(\text{CH}_2)$	2850
		$\nu_{as}(\text{CD}_2)$	2195
		$\nu_s(\text{CD}_2)$	2090
Peptide	Bande Amide 1	ν_{CO} (76%), ν_{CN} (14%), d_{CCN} (10%)	1600-1700
	Bande Amide 2	ib_{NH} (43%), ν_{CN} (29%), ib_{CO} (11%), ν_{CC} (9%), ν_{NC} (8%)	1510-1580

Ainsi, sur un même lipide, les modes de vibration associés aux groupements choline et phosphate caractérisent la tête polaire, l'élongation du groupement carbonyle renseigne sur la région interfaciale, alors que l'élongation CH₂ (ou CD₂ dans le cas de lipides deutérés) fournit de l'information sur l'ordre conformationnel des chaînes acyle, notamment l'isomérisation trans-gauche. Sur les spectres infrarouge, l'ordonnée correspond à l'intensité de la raie donnée en unités d'absorbance (u.a.), alors que l'abscisse est l'axe en fréquence (ou nombre d'ondes) donnée en cm⁻¹. Les spectres infrarouge de la Figure 2.20 représentent les régions caractéristiques pour les lipides, où chaque bande est caractérisée par son intensité, sa largeur et sa fréquence.

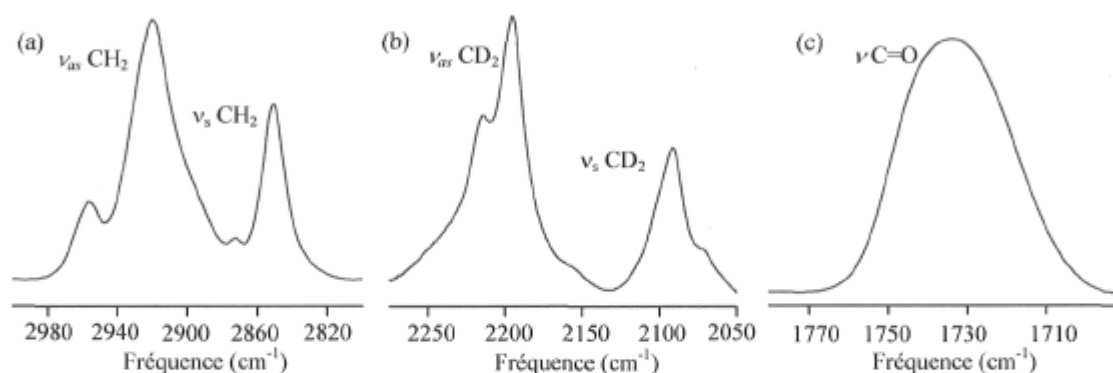


Figure 2.20: Spectres infrarouge des régions caractéristiques des lipides de vésicules multilamellaires de DMPC: (a) Modes d'élongation CH₂ symétrique (ν_s CH₂) et antisymétrique (ν_{as} CH₂), (b) Modes d'élongation CD₂ symétrique (ν_s CD₂) et antisymétrique (ν_{as} CD₂), et (c) Mode d'élongation C=O (ν C=O).

Un autre aspect important de la spectroscopie IR-TF est son utilité dans l'étude des transitions de phase des lipides (228, 230). En effet, les lipides sont des molécules amphiphiles formant dans la grande majorité des cas des structures en bicouches stables. Ces bicouches existent dans des états physiques différents, soient les phases gel (ou rigide ordonnée) et fluide (ou liquide cristalline désordonnée). Les transitions d'une phase gel à une phase fluide sont induites par une augmentation de la température et génèrent des changements conformationnels considérables dans les chaînes acyle (227). Ce changement de conformation des chaînes acyle s'étudie par l'analyse des fréquences d'élongation des

groupement CH_2 (ou CD_2). Ainsi, en deçà de la température de transition de phase, les chaînes acyle sont dans une phase gel et majoritairement en conformation tout-trans. En augmentant la température au-delà de la température de transition de phase propre à chaque lipide, il y a introduction de conformères gauche qui désordonnent les chaînes acyle. Sur les spectres IR-TF, ceci se traduit par une augmentation en fréquence des bandes d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements CH_2 ou CD_2 de $2\text{-}5\text{ cm}^{-1}$ en fonction de la température. Ce phénomène s'appelle le thermotropisme. Selon la nature du phospholipide, d'autres phases peuvent également être étudiées, telles que les phases non lamellaires de type hexagonale inverse pour les lipides phosphatidyléthanolamine (230). Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la région interfaciale des bicouches lipidiques caractérisée par l'élongation du groupement carbonyle $\text{C}=\text{O}$. Nous verrons maintenant le type d'information que nous pouvons tirer de l'étude de cette bande dans le cadre des interactions lipides/peptides.

2.4.2 Vibration d'élongation du groupement carbonyle des lipides

La bande d'élongation du carbonyle $\text{C}=\text{O}$ associé au groupement ester des phospholipides est une bande très utile pour l'étude de la région interfaciale des bicouches lipidiques. Pour les systèmes lipidiques hydratés, cette bande est relativement large, asymétrique et centré à environ 1733 cm^{-1} . L'asymétrie et la largeur de la bande $\text{C}=\text{O}$ s'explique par le fait que cette bande est la superposition de deux bandes centrées respectivement aux environs de $1738\text{-}1742\text{ cm}^{-1}$ et $1724\text{-}1729\text{ cm}^{-1}$ (230-232). Ces deux bandes peuvent être partiellement résolues en appliquant la déconvolution spectrale (233).

L'information que nous tirons de l'étude de la bande carbonyle est reliée à l'environnement de ce groupement, c'est-à-dire au patron de liaisons hydrogène, à l'hydratation des bicouches et à la polarité du milieu (227, 230, 234). Les bandes situées à haute fréquence ($\sim 1742\text{ cm}^{-1}$) et basse fréquence ($\sim 1728\text{ cm}^{-1}$) sont associées respectivement aux groupements $\text{C}=\text{O}$ libres (ν) et aux groupements $\text{C}=\text{O}$ formant des

liaisons hydrogène (ν_b) avec son environnement (231). La Figure 2.21 illustre des spectres IR-TF enregistrés à trois températures différentes pour la bande C=O de vésicules multilamellaires hydratées de DMPG.

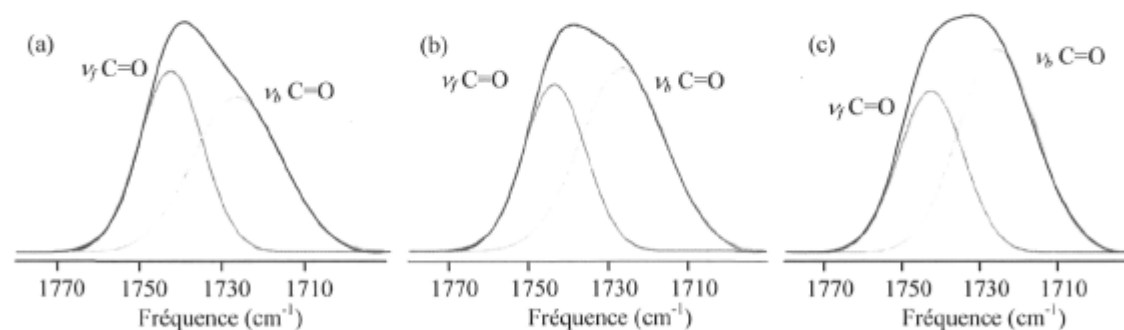


Figure 2.21: Spectres infrarouge de vésicules multilamellaires hydratées de DMPG enregistrés à trois températures différentes: (a) 15°C, (b) 23°C, et (c) 50°C. Les composantes en bleu et en vert sont associées aux groupements C=O libres (ν_f) et aux groupements C=O formant des liaisons hydrogène (ν_b).

Les phospholipides DMPG possèdent une température de transition de la phase gel à la phase fluide de 23°C. Au fur et à mesure que la température augmente, passant d'une température en phase gel (15°C), à une température correspondant à la transition de phase gel-fluide (23°C), à une température en phase fluide (50°C), l'intensité de la bande à 1742 cm^{-1} diminue alors que l'intensité de la bande à 1728 cm^{-1} augmente. Ces variations d'intensité s'expliquent par le fait que les bicouches lipidiques en phase fluide sont mieux hydratées que les bicouches en phase gel (231). Ainsi, l'étude du patron d'hydratation du groupement carbonyle via l'analyse de l'intensité et de la largeur des bandes à 1728 cm^{-1} et 1742 cm^{-1} peut informer sur les interactions lipides/peptides à l'interface des bicouches lipidiques.

Chapitre 3

Biophysical Studies of the Interactions between 14-mer and 21-mer Model Amphipathic Peptides and Membranes: Insights on their Modes of Action

Marise Ouellet, François Otis, Normand Voyer et Michèle Auger
(2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1235-1244.

3.1 Résumé

Nous avons étudié les interactions entre des peptides amphiphiles synthétiques et des membranes modèles zwitterioniques. Les peptides de 14 et 21 acides aminés composés de leucines et phénylalanines modifiées par l'addition d'éthers en couronne ont été synthétisés. Des études de dichroïsme circulaire ont révélé que les peptides 14-mère et 21-mère possèdent tous deux une structure hélicoïdale amphiphile. Pour apporter davantage d'information quant à leur mécanisme d'interaction membranaire, différentes techniques biophysiques complémentaires ont été utilisées telles que la spectrométrie de dichroïsme circulaire et de fluorescence, les mesures de conductivité membranaire et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Les résultats obtenus par ces différentes techniques démontrent que le peptide 14-mère est un perturbateur membranaire facilitant le relargage de calcéine et d'ions ^{23}Na de vésicules lipidiques, alors que le 21-mère agit comme un canal ionique. Les expériences de RMN à l'état solide du phosphore-31 sur des vésicules multilamellaires démontrent que la dynamique et/ou l'orientation des têtes polaires sont affectées par la présence des peptides. Des résultats similaires ont été obtenus sur des bicouches de DLPC et DMPC orientées entre plaques de verre où des longueurs de chaîne variables semblent jouer un rôle dans l'interaction des peptides. D'un autre côté, les expériences en deutérium réalisées sur des vésicules multilamellaires démontrent que l'ordre des chaînes acyle est affecté différemment par les deux peptides. Selon les résultats de ces études, des mécanismes d'action plausibles sont proposés pour les peptides 14-mère et 21-mère en interaction avec des membranes zwitterioniques.

3.2 Abstract

We have investigated the interactions between synthetic amphipathic peptides and zwitterionic model membranes. Peptides with 14 and 21 amino acids composed of leucines and phenylalanines modified by the addition of crown ethers have been synthesized. The 14-mer and 21-mer peptides both possess a helical amphipathic structure as revealed by circular dichroism. To shed light on their mechanism of membrane interaction, different complementary biophysical techniques have been used such as circular dichroism, fluorescence, membrane conductivity measurement and NMR spectroscopy. Results obtained by these different techniques show that the 14-mer peptide is a membrane perturber that facilitates the leakage of species such as calcein and Na ions, while the 21-mer peptide acts as an ion channel. ^{31}P solid-state NMR experiments on multilamellar vesicles reveal that the dynamics and/or orientation of the polar headgroups are greatly affected by the presence of the peptides. Similar results have also been obtained in mechanically oriented DLPC and DMPC bilayers where different acyl chain lengths seem to play a role in the interaction. On the other hand, ^2H NMR experiments on multilamellar vesicles demonstrate that the acyl chain order is affected differently by the two peptides. Based on these studies, mechanisms of action are proposed for the 14-mer and 21-mer peptides with zwitterionic membranes.

3.3 Introduction

In the last few decades, bacterial resistance against commonly used antibiotics has become an increasingly important public health problem. Enormous efforts are devoted to reduce the number of antibiotic resistant bacteria. Scientists have therefore concentrated their efforts on the elucidation of bacterial cell functions to identify new bacterial targets, and on the design and development of new classes of antimicrobial agents that possess novel modes of action that could overcome known mechanisms of bacterial resistance (2, 8,

235-237). The focus of the present review is on the design and synthesis of novel potential antimicrobial compounds.

More than 880 different antimicrobial peptides, which are an important component of the defense system of a variety of species such as mammals, plants, insects, viruses and bacteria, have been reported or predicted from nucleic acid sequences and they became the focus of many researches (8, 16, 23). Despite the fact that natural antimicrobial peptides do not show primary structure homology, they possess the following general trends: they are relatively small, they have a net positive charge of +2 to +7, they adopt a variety of three dimensional structures such as α -helix and β -sheet conformations conferring an amphipathic character, they possess a broad spectrum of activity and they are recognized to kill bacteria rapidly so they do not contribute to the rapid emergence of resistance (16, 17, 19, 24, 25, 43).

Antimicrobial peptides as a source of potential therapeutic agents have brought the scientific community to shed light on the structural parameters required for their antimicrobial activity, in an ultimate goal of elucidating their mechanisms of action. A better understanding of these mechanisms will allow the design of novel therapeutic peptides that possess the required specificity against bacteria and that act via new modes of action defying most of the known mechanisms of bacterial resistance (8). Despite the characteristics listed above, several natural antimicrobial peptides such as melittin from bee venom present the disadvantage of being toxic to eukaryotic cells (238). Many research groups have therefore oriented their work on the design and synthesis of model antimicrobial peptides with increased antimicrobial activity and reduced toxicity to eukaryotic cells. The synthetic peptide approach in a view of examining variations in structural parameters such as hydrophobicity/hydrophilicity balance, amphipathicity, charge and helicity will enable rapid progress in the design of selective antimicrobial peptides in an efficient way (75). These studies have brought new information on the structural parameters required for the desired antimicrobial activity, and general

mechanisms of action that follow from such parameters have been suggested, such as the “carpet-like”, “barrel-stave” and “toroidal” mechanisms (29, 56, 57, 67, 239, 240).

For example, Stark et al. have designed a new category of nonamphipathic hydrophobic antimicrobial peptides that seem to selectively permeabilize bacterial cells via the “carpet-like” mechanism (241). From their study, they concluded that the antimicrobial activity coincides with a threshold hydrophobicity that is required for peptide insertion into bacterial membranes. A 26-residue peptide with varying *D*- and *L*-amino acids in the primary sequence has been studied by Chen et al. to investigate the effect of peptide hydrophobicity/hydrophilicity balance, amphipathicity and helicity on biological activity (75). Synthetic peptides with ingenious conformation named antimicrobial dendrimeric peptides, that can be easily chemically modified to amplify the antimicrobial activity, have been synthesized by Tam et al. (242). By varying the size of the dendrimeric peptides, they have obtained an optimal peptide with four branched lysine residues that adopts a barrel-like structure with high antimicrobial activity without hemolysis. Many research groups have focused their attention on hybrids of natural antimicrobial peptides such as, for example, the cecropin-melittin hybrids (243-246). By joining specific amino acid sequences from natural antimicrobial peptides, they have obtained very promising hybrids with improved antimicrobial activity without hemolytic properties. Schmitt et al. and Epanand et al. have both oriented their research on the design and structure-function study of synthetic peptides composed of unnatural β -amino acids called β -17 peptides and an alternance of α - and β -amino acids called α,β -peptides (247-249). Variation in the helical conformation of these foldamers confers different biological activities that can be correlated to the amphipathic character of the helical structure. The membrane permeabilization activity of the peptides listed above has been tested on model membranes and on the membranes of both Gram-negative and Gram-positive bacteria. These studies have revealed that the lipid membrane of prokaryotic and/or eukaryotic cells seems to be the primary or final target of such peptides and that their biological activity appears to be modulated by peptide structural parameters such as helicity, positive charge, amphipathic character and hydrophobicity (76, 85, 250-252).

Another interesting point to be addressed here is the design of ion channel peptides. Many natural antimicrobial peptides acting via a channel mechanism and pore-forming helical peptides are reported in the literature (253). Ion channel peptides are promising antimicrobial agents since they could affect the bacterial membrane electrochemical potential and then kill the pathogens (254). Many research groups and in particular DeGrado et al. have elucidated the structural parameters required for membrane channel activity and they designed model ion channel peptides (255-257). The model developed by DeGrado is a 21-residue peptide composed of leucine and serine residues. This peptide was shown to form ion channels and showed ion permeability and open lifetime properties similar to the acetylcholine receptor (258-260). Fernandez-Lopez et al. have also designed cyclic *D,L*- α -peptides able to selectively target and self-assemble in bacterial membranes to exert antibacterial activity by increasing membrane permeability (261). For a detailed list of synthetic model ion channel peptides, the readers are referred to the paper of Gokel et al. (257).

3.4 Model amphipathic peptides containing crown ethers

Inspired by the promising future of synthetic antimicrobial peptides as an alternative to antibiotics, the research group of N. Voyer has concentrated its efforts on the design and synthesis of novel model peptides presenting various membrane activities. The general idea was to use an α -helical peptidic framework made from leucines and phenylalanines modified with crown ethers (101). These amino acids are known to increase the helical propensity of the chain and crown ethers are ingeniously positioned to lead to their alignment under a helical conformation. This organization is useful for two reasons. First, once incorporated into membranes, the peptide can allow ion translocation from one crown ether to another and thus create a channel (100, 262). Second, the polar crown ethers on the same side and the hydrophobic leucines on the other side result in an amphipathic peptide that can mimic properties of natural membrane-active peptides (97). A 21-mer peptide was first designed, since it has the required length to fit in biological membranes and it could therefore act as an ion channel. In addition, a 14-mer peptide was designed as a lytic

peptide that could more easily disturb membranes because of its shorter length not matching a membrane thickness. These peptides were prepared by solid-phase peptide synthesis on oxime resin, a technique that has been shown to be fast and efficient (90, 263). This strategy allows easy modifications at the *N*- and *C*-termini by peptidic coupling or nucleophilic cleavage to rapidly obtain a wide variety of analogues (264, 265). Protected and fully deprotected compounds have been synthesized, and other peptides bearing more or less polar terminal groups were also prepared (Figure 3.1). Unless indicated otherwise, the peptides investigated in the present study are the 14-mer peptide with $n = 2$ and $Y = \text{OH}$ (peptide B) and the 21-mer peptide with $n = 3$ and $Y = \text{OCH}_3$ (peptide C).

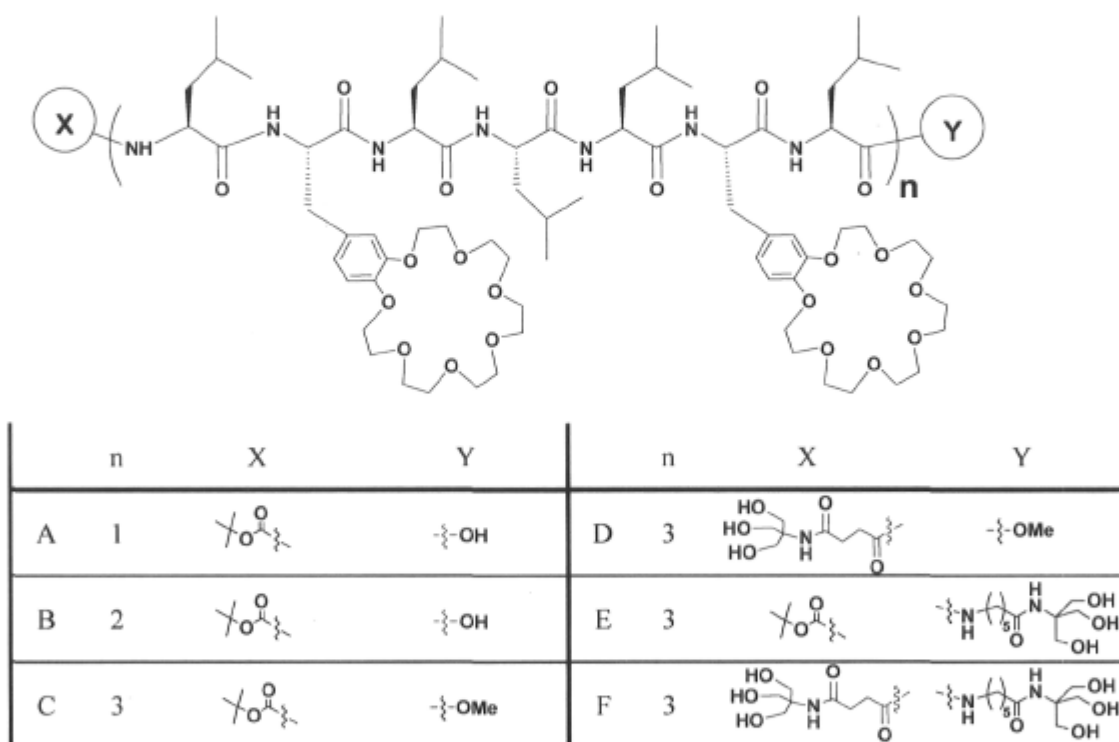


Figure 3.1: 7-mer, 14-mer and 21-mer peptides with different N-terminal and C-terminal groups. Unless indicated otherwise, the peptides investigated in the present study are the 14-mer peptide with $n = 2$ and $Y = \text{OH}$ (peptide B) and the 21-mer peptide with $n = 3$ and $Y = \text{OCH}_3$ (peptide C) (266).

Since the biological membrane seems to be the target of several natural and synthetic antimicrobial peptides, the structure and function of the 14-mer and 21-mer peptides have been investigated in synthetic model membranes. The advantage of model lipid bilayers resides in the fact that the physical state as well as the chemical composition of these membranes can be easily modified using zwitterionic and/or anionic lipids to mimic eukaryotic and bacterial membranes. Lipid vesicles with different sizes can also be prepared. Multilamellar vesicles with typical sizes of the order of a micron were used for NMR studies (267), while lipid vesicles with sizes between 175-200 nm were prepared via extrusion and filtration with micro-pore filters for leakage studies (268).

Notably, unlike most known natural and synthetic antimicrobial peptides, the 14-mer and 21-mer peptides used in the present study do not possess a net positive charge. Their neutral nature allows the study of the effect of hydrophobic forces in the interaction with lipids without the influence of strong electrostatic interactions.

3.5 Conformation of the 14-mer and 21-mer peptides

Circular dichroism (CD) spectropolarimetry was used to investigate the conformation of the 14-mer and the 21-mer peptides both in solution and bound to lipid bilayers. Measurements were performed in trifluoroethanol with a peptide concentration of 1.0 mg/mL and in egg yolk lecithin vesicles with a lipid/peptide molar ratio of 80:1. In the latter case, the lipids and peptides were codissolved in chloroform prior to sample hydration. The specific dichroic signatures of conformations such as α -helix, β -sheet and random coil are well documented. For α -helices, two minima at 208 and 222 nm are expected, for β -sheets structure a minimum at 215 nm is observed, while the random coil conformation gives a minimum at 195 nm and a maximum at 220 nm. Figure 3.2 displays the CD spectra of the 14-mer and the 21-mer peptides both in TFE and in lipid vesicles. All CD spectra revealed that the 14-mer and 21-mer peptides exhibit an α -helical conformation in both media. An interesting point to note here is the partial disappearance of the

component at 209 nm on the CD spectrum of the 21-mer peptide in vesicles (Figure 3.2). It has already been reported that the extent of this disappearance varies with the cell path length at constant concentration. A similar CD behavior has already been reported in the literature for α -helical peptides incorporated in lipid bilayers. This phenomenon has been suggested to be associated with the orientation of the helical peptides in the lipid bilayer on the quartz surface (91). CD studies at different concentrations (0.1 μ M-0.1 mM) also point out that the 21-mer peptide and its analogues do not tend to aggregate in low polarity environment as suggested by the conservation of the ellipticity at 222 nm (100).

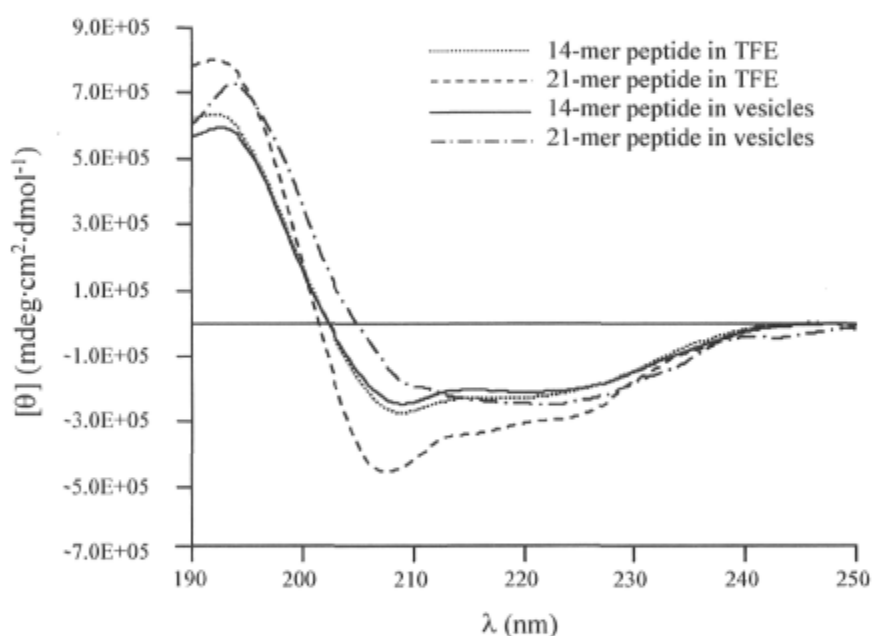


Figure 3.2: CD spectra of the 14-mer and the 21-mer peptides in solution (TFE) at a concentration of 0.1 M, and bound to egg lecithin vesicles at a lipid/peptide molar ratio of 80:1. Adapted from reference (100) and reproduced with permissions.

3.6 Transport and lytic activity of the 14-mer and 21-mer peptides

To investigate the transport and lytic properties of the crown peptides, different complementary techniques have been used such as pH-stat, monomolecular membrane conductivity, ^{23}Na NMR and calcein fluorescence spectroscopies.

3.6.1 pH-stat

The pH-stat technique is based on the pH difference between the internal and external environment of unilamellar lipid vesicles (269). Essentially, vesicles made with an internal pH of 6.6 are placed in an external solution of pH 7.6. Then specific ions and FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) (270), a proton carrier, are added and transport ability can be monitored by the release of protons required to maintain the electroneutrality across the vesicle membranes (271). Results obtained in PC/PA/cholesterol vesicles with the 21-mer peptide indicate a similar Cs^+ transport activity as gramicidin A, a peptide known to form very efficient ion channels (101). Moreover, the 21-mer peptide showed comparable activities with Li^+ , Na^+ , K^+ and Rb^+ , while analogues without crown ethers and the monomer of a crown ether phenylalanine showed only very weak transport typical of a carrier mechanism. These results suggest that the 21-mer peptide effects ion transport via a channel mechanism and that ions most probably pass through the crown ether stack instead of through a pore formed by self-assembled peptides. On the other hand, the addition of Triton X-100 at the end of every experiment led to the complete lysis of the vesicles and the release of entrapped H^+ , which demonstrates that the vesicles are still intact at the end of the assay and that the 21-mer peptide does not act as a surfactant.

3.6.2 Monomolecular membrane conductivity

To further characterize the transport ability of the 21-mer peptide, single-channel measurements (272, 273) have been performed using a modified patch clamp technique (274). This technique is based on the measurement of the electric current resulting of ions passing through a diphytanoylglycerolphosphocholine (DiPhy) bilayer adsorbed on a pipette tip. Results with the 21-mer peptide in the presence of K^+ show typical transitions (steps) between “closed” and “open” states, that are characteristic of ion channel activity observed with natural channel proteins (100, 262). In DiPhy membranes, the 21-mer peptide has a current level of 2.5 ± 0.2 pA with an average lifetime for the open states of about 1 s. Furthermore, experiments with the 21-mer peptide bearing smaller 18-crown-6 moieties showed a conductivity of 3.5 ± 0.2 pA and average lifetime of opening of 100-200 ms, differing greatly from results obtained with 21-crown-7 channel and supporting that ions travel across the crown ether stack (J.-C. Meillon, N. Voyer, unpublished results). These results agree with the conclusions from the pH-stat studies and strongly support a channel mechanism.

3.6.3 ^{23}Na NMR

In order to further validate the channel activity of the 21-mer peptide and to screen more analogues, a dynamic NMR method has been used. This method allows a good evaluation of sodium channel transport activity without any driving force. Based on the differentiation of Na^+ inside and outside phospholipid vesicles by the use of Dy^{3+} as shift reagent, this technique provides an exchange rate of Na^+ ions through model membranes and has been successfully applied to gramicidin and artificial ion channels (268, 275, 276). Studies have demonstrated that the transport activity of the 21-mer peptide, even if it corresponds to 3% of that of gramicidin D, is 30 times higher than that of an analogue bearing smaller rings (18-crown-6) and more than 600 times higher than that of peptides with even smaller rings (14-crown-4 and 13-crown-3) (90). This strongly supports the

monomolecular channel mechanism of the 21-mer peptide and the hypothesis that Na^+ ions travel through the crown ring channel instead of through a pore formed by the aggregation of peptides, which is in agreement with CD and patch clamp studies. Furthermore, addition of a non-ionic hydrophilic head group at the *N*-terminal of the 21-mer peptide (peptide D) resulted in an increase by 2.7 times of the Na^+ transport activity, while the transport is only slightly improved for *C*-polar terminal 21-mer peptide (peptide E) and *N,C*-polar termini 21-mer peptide (peptide F) (266).

These results suggest that the addition of a polar group at the *N*-terminal position increases the stability of the peptide in the membrane without decreasing its incorporation. Furthermore, it demonstrates that the transport activity can be enhanced with different peptide extremities and opens the way to the incorporation of molecular recognition elements for selective targeting. Finally, the results obtained with the 14-mer peptide indicate a similar transport activity than for the 21-mer peptide, even if the length of the peptide is shorter than the thickness of the bilayer. This is most likely due to the fact that the lysis of vesicles produces the same signal as transport. It is therefore very difficult to discriminate the two phenomena by this NMR technique.

3.6.4 Fluorescence studies

Fluorescence assays have also been performed to verify that the activity observed by ^{23}Na NMR for the 21-mer peptide is not due to the lysis of vesicles and to demonstrate the lytic ability of the 14-mer peptide. The vesicle lysis experiment is based on the increase of the self-quenched fluorescence of calcein upon lysis (97, 277). Figure 3.3 shows the calcein release profile induced by the addition of the 14-mer and the 21-mer peptides to lipid vesicles.

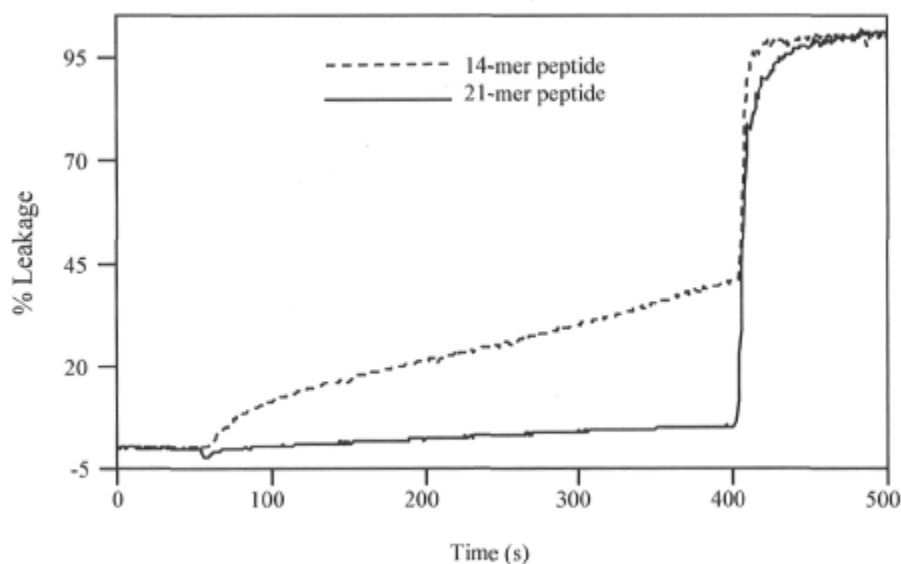


Figure 3.3: Calcein leakage induced by the addition of the 14-mer and the 21-mer peptides (5 mM) to phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine (1:1) vesicles in HEPES 100 mM, NaCl 170 mM, EDTA 5 mM at pH 7.4. Vesicles were lysed with Triton X-100 at 400 s. Adapted from reference (97) and reproduced with permissions.

These results indicate that the 21-mer peptide induces very little lysis, which is also the case for the *N*-polar terminal 21-mer peptide (peptide D), *C*-polar terminal 21-mer peptide (peptide E) and *N,C*-polar termini 21-mer peptide (peptide F) bearing one or two polar headgroups (data not shown) (90, 266). These results confirm that the activity observed in the ^{23}Na NMR assay reflects the transport ability of the 21-mer artificial channel. On the other hand, the 14-mer peptide clearly induces a rapid and significant release of calcein. This particularity demonstrates the ability of the 14-mer peptide to act as a lytic agent as predicted.

3.7 Effects of the 14-mer and 21-mer peptides on model membranes

This section will be devoted to the study of the effect of the 14-mer and 21-mer peptides on lipid bilayers by a combination of ^{31}P and ^2H solid-state NMR spectroscopy.

These two techniques allow the study of both the polar and the hydrophobic regions of the lipid bilayer. Both peptides have been investigated with fully hydrated zwitterionic multilamellar vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1, and with fully hydrated mechanically oriented bilayers of dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) and DMPC at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

3.7.1 ^{31}P NMR spectroscopy

Phosphorus-31 has a spin- $\frac{1}{2}$ and a 100% natural abundance, and, due to its good sensitivity, is extremely useful to investigate the structure and dynamics of the polar headgroup of phospholipids, which are the main constituent of biological membranes (198). In particular, it is possible to obtain static ^{31}P NMR spectra which are dominated by the chemical shift anisotropy (CSA), to use the magic-angle spinning (MAS) technique that averages the CSA to its isotropic value, and finally to use samples macroscopically oriented in the magnetic field. The general conclusions that will be presented in this section for the 14-mer and 21-mer peptides in interaction with lipids refer to the shape of the vesicles, the dynamics and/or orientation of the polar headgroup upon peptide binding to unoriented vesicles, and also on the perturbing effect of the peptides on membrane orientation and the influence of acyl chain length on the interaction between peptides and mechanically aligned bilayers of DLPC and DMPC.

The ^{31}P NMR spectra of the DMPC vesicles revealed that the 14-mer and the 21-mer peptides increase the dynamics and/or induce changes in the polar headgroup orientation since a decrease of the CSA has been observed. The shape of the DMPC vesicles in the presence of the 14-mer and the 21-mer peptides also demonstrate a greater 0° orientation of the lipidic molecules, i.e. with the lipid long axis preferentially oriented parallel to the magnetic field direction upon peptide binding. A partial 90° orientation is observed for the pure system, i.e. an ellipsoidal vesicular shape in which the long axis is oriented preferentially perpendicular to the magnetic field direction (113, 278). The greater

0° orientation is reflected on the ^{31}P NMR spectra by an increase of the spectrum shoulder at approximately 30.0 ppm. The change in the DMPC vesicular shape could be explained by a change in the elastic properties of the vesicles or by a modification of the magnetic susceptibility of the lipid molecules upon peptide binding (114, 115, 118).

A decrease in the CSA is in good agreement with changes in the dynamics and/or orientation of the lipid polar headgroup. Such perturbation could be explained by the amphipathic nature of the peptides. When adsorbed at the bilayer surface, the crown ethers are facing the aqueous phase while the hydrophobic contour of the helix is facing the hydrophobic core of the bilayer. This interfacial interaction could result in a change in the dynamics and/or orientation of the polar headgroup. Similar results have been reported by Bonev et al. who have studied the interaction between DMPC and sphingomyelin (10% mol) membranes and equinatoxin II (279). Huster et al. have also studied the colicin Ia channel in interaction with POPC/POPG vesicles and they concluded that colicin Ia interacts with the lipid bilayer since a smaller ^{31}P CSA has been observed (280). Several other groups have also performed ^{31}P NMR experiments on antimicrobial and human peptides (281-284). They all attributed a decrease in the CSA to a perturbation of the lipid headgroup packing.

We have also used ^{31}P NMR to investigate the interaction between the 14-mer and 21-mer peptides with lipid bilayers oriented between glass plates (285-287) prior to the determination of their membrane topology by ^{15}N NMR spectroscopy. Two different types of lipids have been used, namely DLPC and DMPC that possess acyl chains of 12 and 14 carbon atoms, respectively. The choice of lipids has been made by considering the hydrophobic match/mismatch between the bilayers and peptides. Assuming that the 14-mer and 21-mer peptides adopt a perfect α -helical structure, their length would be 21.0 Å and 31.5 Å, while the hydrophobic thickness of DLPC and DMPC is estimated at 20.0 Å and 23.0 Å, respectively (288, 289).

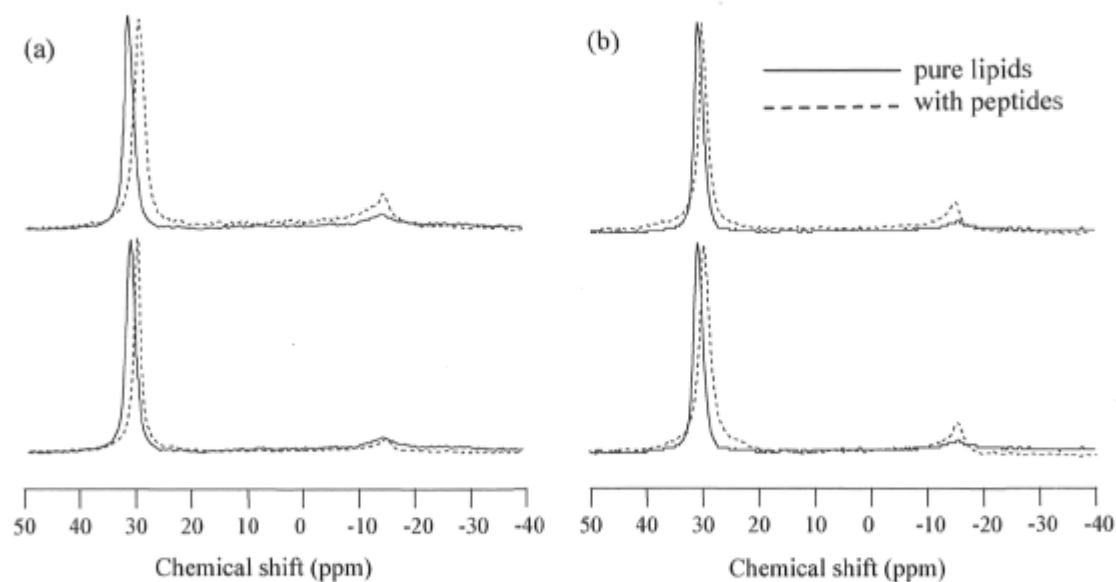


Figure 3.4: Oriented ^{31}P solid-state NMR spectra of: (a) DLPC bilayers containing the 14-mer (*top trace*) and 21-mer (*bottom trace*) peptides; (b) DMPC bilayers containing the 14-mer (*top trace*) and 21-mer (*bottom trace*) peptides, at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 and at 37°C.

The ^{31}P NMR oriented spectra of pure DLPC and DMPC bilayers (Figure 3.4, solid lines) show sharp resonances at 31.2 ppm and 30.7 ppm, characteristics of lipid bilayers oriented with their normal parallel to the magnetic field direction. In DLPC bilayers, the 14-mer peptide (Figure 3.4(a), *top trace*) induces a broadening of 0.4 ppm and a shift to lower chemical shift (upfield shift) of 2.0 ppm, while the 21-mer peptide (Figure 3.4(a), *bottom trace*) induces a narrowing of the resonance by 0.5 ppm and an upfield shift of 1.0 ppm. In DMPC bilayers, there is a narrowing (broadening) of the resonance by 0.2 (0.2 ppm) with the 14-mer (21-mer) peptide (Figure 3.4(b), *top trace* (*bottom trace*)). Since opposite effects are observed for the 14-mer and 21-mer peptides in DLPC and DMPC, and that the length of the 14-mer peptide fits the hydrophobic length of DLPC bilayers while the length of the 21-mer peptide better fits the hydrophobic length of DMPC bilayers, we can suppose that the hydrophobic match/mismatch affects the peptide/lipid interactions. Based on these results, we can expect a transmembrane (in-plane) orientation of the 14-mer

peptide in DLPC (DMPC) bilayers, while the 21-mer peptide is most susceptible to be oriented in an in-plane (transmembrane) orientation in DLPC (DMPC) bilayers.

We cannot however rule out the possibility that the 21-mer peptide could be tilted in DLPC bilayers to compensate for hydrophobic mismatch instead of having an in-plane orientation. A similar case has already been reported by Park et al. who have studied the variation in the tilt angle of the transmembrane helix of Vpu peptide depending on the bilayer thickness (290). They reported that the tilt angle is changed from 27° in 14:0-*O*-PC/PG to 51° in 10:0 PC/10:0 PG lipid bilayers.

3.7.2 ²H NMR spectroscopy

²H NMR spectroscopy is a very powerful technique to study the membrane hydrophobic core by replacing the acyl chain protons by deuterons. Deuterium is a spin-1 nucleus with a quadrupole moment that interacts with the electric field gradient at the nucleus, giving rise to the quadrupolar interaction. Two spin transitions are possible and a doublet of resonances is observed on a ²H NMR spectrum, separated by the quadrupolar splitting $\Delta\nu_Q$. For a system with axially symmetric motions, the quadrupolar splitting is given by:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} (3 \cos^2 \theta - 1) S_{CD} \quad (3.1)$$

where $(e^2 q Q/h)$ is the quadrupole coupling constant (~ 170 kHz for aliphatic C-D) (203), θ is the angle between the bilayer normal and the external magnetic field B_0 , and S_{CD} is the order parameter of a deuterium bond vector. As described extensively, this order parameter is the product of several contributions, including intramolecular motions such as trans-gauche isomerizations, and anisotropic reorientation of the whole phospholipid molecules.

Therefore, it is possible to determine variations in lipid chain order by monitoring changes in $\Delta\nu_Q$ values (291).

The ^2H NMR spectra of the DMPC vesicles in the presence of the 14-mer peptide show an increase in the quadrupolar splitting $\Delta\nu_Q$ at the plateau region while there is no change in $\Delta\nu_Q$ upon the 21-mer peptide binding (278). The increase in $\Delta\nu_Q$ reflects the stabilization on the lipid acyl chains in the presence of the 14-mer peptide. These results suggest that the peptide is located at the surface of the bilayer. Dufourc et al. have observed a similar behavior with melittin (292, 293). They associated their results to a location of melittin at the surface of the bilayer, capping the lipid headgroups and leading to a greater chain packing. A deeper insertion of melittin in the bilayer results in a disordering effect of the hydrophobic core. This situation could be explained by the presence of a hydrophobic mismatch between melittin and the lipid bilayer. In our case however, no change is observed in the packing of the DMPC acyl chains in the presence of the 21-mer peptide. This could be explained by the fact that the 21-mer peptide and the DMPC bilayers do not present a significant hydrophobic mismatch, which would support a transmembrane orientation of the 21-mer peptide in the bilayer. However, a location of the peptide at the bilayer surface with no direct effect on the acyl chain ordering is also conceivable. De Planque et al. concluded that a hydrophobic match between the bilayer and the peptide gramicidin A results in a non-perturbed bilayer since no adjustment has to be done to compensate for hydrophobic mismatch (289, 294). Belohorcova et al. also reported that a membrane spanning peptide has little effect on lipid chain order if its hydrophobic length closely matches the lipid hydrophobic thickness (295). Hence, the 14-mer peptide seems to be located at the surface of the bilayer, while the topology of the 21-mer peptide has not yet been precisely determined. Further experiments such as ^{15}N NMR experiments in oriented bilayers are currently underway with both peptides to conclude on their membrane topologies.

3.8 Proposed mechanisms of action

The aim of the present work was to shed light on the interactions between synthetic amphipathic peptides and model membranes to better understand the mechanisms of action of antimicrobial peptides. First, circular dichroism has been used to confirm the helical conformation of the 14-mer and 21-mer peptides both in solution and bound to lipid bilayers. Under such a helical conformation, crown ethers are sequestered on one side of the α -helix and confer an amphipathic character to the peptides. Secondly, pH-stat and single-channel measurements, and ^{23}Na NMR spectroscopy have shown that the 21-mer peptide acts as an artificial ion channel by promoting the transport of ions across the lipid bilayer. In addition, calcein leakage experiments by fluorescence spectroscopy, ^{23}Na NMR spectroscopy and lysis of erythrocytes (97) by visible spectroscopy have all confirmed the permeabilization activity of the 14-mer peptide and the non-lytic activity of the 21-mer peptide. Since ion transport studies indicated that both peptides interact in a different manner with lipid membranes, ^{31}P and ^2H solid-state NMR studies have been done on multilamellar vesicles and oriented membranes to gain information on the interaction of the peptides with lipid bilayers. These NMR experiments have allowed us to probe the effects of the 14-mer and 21-mer peptides at two different regions of the bilayer, namely the polar headgroup and the hydrophobic core. All these experiments have permitted us to suggest models of interaction as depicted in Figure 3.5.



Figure 3.5: Proposed models for the binding of the 14-mer (*left*) and 21-mer (*right*) peptides to DMPC bilayers. Those cartoons represent a static caption of the lipid/peptide interaction and are not drawn on scale. The 14-mer peptide is inserted in the hydrophobic core of the bilayer and adopts an in-plane orientation with the leucine hydrophobic side chains interdigitating the hydrocarbon lipid chains. In DMPC bilayers, the 21-mer peptide is in equilibrium between in-plane and transmembrane orientations that are consistent with previous single-channel conductivity and ATR studies (see text for details).

The results strongly suggest that the 14-mer peptide is located at the surface of the DMPC bilayer in an in-plane orientation that minimizes the hydrophobic mismatch between the peptide and the bilayer and it interacts with the polar headgroup of the lipids. The perturbing effect of the polar headgroup reflected on the ^{31}P NMR spectra as well as its perturbing effect on the membrane permeabilization could be explained by its inverse-cone shape. According to Epand et al., this peptide belongs to the structural class A in which the region occupied by the hydrophilic part on the amphipathic helix is larger than the hydrophobic region, and this shape is recognized to induce positive curvature in the bilayer (251). Such effect has also been reported by Ramamoorthy et al. who have studied the disruption of the lipid bilayer induced by an analogue of magainin, MSI-78 (296). The induction of a positive curvature by the 14-mer peptide is also supported by a net decrease of calcein leakage of vesicles made of PC and PE lipids (97). The PE lipids possess a cone shape that counterbalances the inverse-cone shape of the 14-mer peptide, and then inhibits the positive curvature imposed on the lipid bilayer. Single-channel measurements and ^{23}Na and solid-state NMR experiments both suggest a partial transmembrane orientation of the 21-mer peptide in a DMPC lipid bilayer. Since there is no significant hydrophobic mismatch between the peptide and the DMPC bilayer, a transmembrane topology of the 21-

mer peptide could account for its single-channel activity. Previous ATR studies have also suggested that the 21-mer peptide could be in equilibrium between in-plane and transmembrane orientations (91), as depicted in Figure 3.5.

3.9 Conclusions

The present study has demonstrated the utility of the design and synthesis of artificial amphipathic peptides to better understand the mechanisms of action of antimicrobial peptides. A better knowledge of the interactions that support these modes of action opens the way to novel classes of antibiotics with different biological activities that defy most known mechanisms of resistance. The study has also shown the potential of various biophysical and spectroscopic techniques to bring complementary information that can be used to shed light on the mechanisms of action of synthetic amphipathic peptides.

3.10 Acknowledgements

The authors wish to thank Pierre Audet and Jean-Daniel Doucet for their technical assistance and helpful discussions. This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), by the Centre de Recherche sur la Structure, Fonction et Ingénierie des Protéines (CREFSIP) and by the Centre de Recherche en Sciences et Ingénierie des Macromolécules (CERSIM). M.O. also wishes to thank NSERC for the award of a postgraduate scholarship.

Chapitre 4

Insights on the Interactions of Synthetic Amphipathic Peptides with Model Membranes as Revealed by ^{31}P and ^2H Solid-State NMR and Infrared Spectroscopies

Marise Ouellet, Genevière Bernard, Normand Voyer et Michèle Auger
(2006) *Biophys. J.*, **90**: 4071-4084.

4.1 Résumé

Nous avons étudié l'interaction entre des peptides amphiphiles synthétiques et des membranes modèles par spectroscopies RMN à l'état solide et infrarouge. Des peptides de 14 et 21 acides aminés composés de leucines et phénylalanines modifiées par l'addition d'éthers en couronne ont été synthétisés. Les peptides 14-mère et 21-mère possèdent tous deux une structure amphiphile hélicoïdale. Pour en apprendre davantage sur leurs interactions membranaires, des expériences en RMN à l'état solide du phosphore-31 et du deutérium ont été réalisées pour les deux peptides en interaction avec des vésicules de dimyristoylphosphatidylcholine en l'absence et en présence de cholestérol, avec des vésicules de dimyristoylphosphatidylglycérol, et des bicelles. Les expériences en RMN ^{31}P sur les vésicules multilamellaires ont révélé que la dynamique et/ou l'orientation des têtes polaires sont affectées par la présence des peptides, alors que les expériences en RMN ^{31}P sur les bicelles indiquent très peu de changement dans la morphologie et l'orientation des bicelles. D'un autre côté, les expériences en RMN ^2H sur les vésicules révèlent que l'ordre des chaînes acyle est différemment affecté selon la composition des membranes lipidiques et la longueur hydrophobe des peptides. Finalement, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été utilisée pour étudier la région interfaciale de la bicouche. À la lumière de ces études, des mécanismes de perturbation membranaire sont proposés pour les peptides 14-mère et 21-mère en interaction avec des membranes modèles, dépendamment de la composition de la bicouche et de la longueur des peptides.

4.2 Abstract

We have studied the interaction between synthetic amphipathic peptides and model membranes by solid-state NMR and infrared spectroscopies. Peptides with 14 and 21 amino acids composed of leucines and phenylalanines modified by the addition of crown ethers were synthesized. The 14-mer and 21-mer peptides both possess a helical amphipathic structure. To shed light on their membrane interaction, ^{31}P and ^2H solid-state NMR experiments were performed on both peptides in interaction with dimyristoylphosphatidylcholine vesicles in the absence and presence of cholesterol, dimyristoylphosphatidylglycerol vesicles and oriented bicelles. ^{31}P NMR experiments on multilamellar vesicles reveal that the dynamics and/or orientation of the polar headgroups are weakly yet markedly affected by the presence of the peptides, whereas ^{31}P NMR experiments on bicelles indicate no significant changes in the morphology and orientation of the bicelles. On the other hand, ^2H NMR experiments on vesicles reveal that the acyl chain order is affected differently depending on the membrane lipidic composition and on the peptide hydrophobic length. Finally, infrared spectroscopy was used to study the interfacial region of the bilayer. Based on these studies, mechanisms of membrane perturbation are proposed for the 14-mer and 21-mer peptides in interaction with model membranes depending on the bilayer composition and peptide length.

4.3 Introduction

The spreading of antibiotic resistance and the mechanisms related among bacteria are becoming an increasingly important global healthcare problem. Therefore, there is an urgent need for novel classes of antimicrobial compounds having new modes of action defying most of the known resistance mechanisms to antibiotics. Antimicrobial peptides have recently become the focus of much research (8, 16). These peptides are an important component of the defense system of a variety of species such as mammals, plants, insects,

viruses and bacteria (16). Most of them are small (12-45 amino acids), cationic, amphipathic, and can adopt different secondary structures in interaction with membranes, such as α -helix and β -sheet conformations (19, 24, 25). Many natural antimicrobial peptides have been extensively studied (ex: melittin, cecropin, magainin, gramicidin, etc.), and these studies have demonstrated that the lipidic membrane of prokaryotic and/or eukaryotic cells seems to be the primary or final target of such peptides. Their activities seem to be modulated both by the structural parameters of the peptides, such as helicity, charge, hydrophobicity, and the lipidic composition and physical state of the membranes (76, 251).

Since the mechanisms of action by which antimicrobial peptides perturb membranes, as well as the structural features involved, are not well understood, many researches have relied on peptide synthesis of analogs and models of natural antimicrobial peptides to shed light on the mechanisms of membrane perturbation and on the structural features that drive these mechanisms. Several mechanisms of action have been proposed, such as the “barrel-stave”, the “carpet-like”, the “toroidal”, the “in-plane diffusion”, and the “detergent-like” models (57).

Solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopies are techniques well suited to investigate the interactions between lipids and peptides since they provide information on the effects of the peptides on different regions of the lipid bilayer, such as the polar headgroup, the interfacial region, and the lipid acyl chains, and several antimicrobial peptides have been studied by these techniques. For example, many members of the magainin family, such as the antimicrobial peptide PGLa, have been shown to interact preferentially with bacterial and negatively charged model membranes via the “carpet-like” model, i.e., in a parallel orientation relative to the bilayer surface (78, 297). Comparable studies have been done with melittin, alamethicin, gramicidin A and S, mastoparan, amphibian peptides (aurein, caerin, citropin and maculatin), colicin Ia, equinatoxin II, human peptide LL-37, protegrin, and nisin, with a view of determining the effects of specific peptide structural parameters and the membrane

lipidic composition in the mutual interactions between peptides and lipids (279, 281, 282, 289, 293, 298-303).

Synthetic peptides have also been studied in details to determine which parameters enhance the antimicrobial activity without increasing the hemolytic action, and the related effects on the structure and conformation of the lipid bilayer (294, 295, 304, 305). Although these studies provide a wealth of information about the factors that dominate peptide-membrane interactions, the specific role of structural parameters remains uncertain and imprecise. Therefore, the knowledge of the mutual influences of different structural parameters is essential for the design of novel classes of agents having effective antimicrobial and low hemolytic properties.

With the goal of better understanding the types of interactions involved in the membrane perturbation of amphipathic peptides, we have designed synthetic helical amphipathic peptides that are oligomers of a repeating unit of five leucine residues and two synthetic 21-crown-7-phenylalanine residues appropriately positioned so that the hydrophilic crown ethers align on one side of the hydrophobic helical axis, to form neutral amphipathic 14-mer and 21-mer peptides (Figure 4.1). Crown ethers were chosen as hydrophilic side chains because once incorporated into membranes, the peptides can allow ion translocation from one crown ether to another and thus create a channel that could destabilize the electrochemical gradient on both sides of the bacterial membrane. It is interesting to note that many other ways have also been reported in the literature to confer amphipathic character to natural and synthetic antimicrobial peptides. For example, Thennarasu et al. reported the addition of octanoic acid to the *N*-terminal region of lipopeptide MSI-843 to enhance its hydrophobic character (306). Sitaram et al. also reported various examples of chemical modifications of natural antimicrobial peptides by addition, deletion or substitution of amino acids (238).

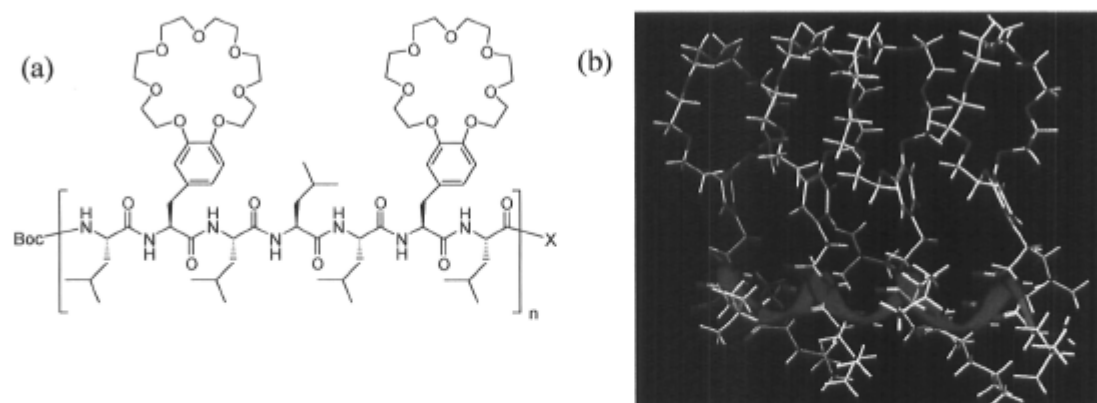


Figure 4.1: (a) Monoprotected 14-mer and diprotected 21-mer peptides used in this study. For the 14-mer peptide, $n = 2$ and $X = \text{OH}$. For the 21-mer peptide, $n = 3$ and $X = \text{OCH}_3$. (b) Three-dimensional view of the 14-mer peptide showing the aligned 21-crown-7-phenylalanines.

Previous studies have shown that both the 14-mer and 21-mer peptides adopt preferentially an amphipathic helicoidal conformation and act as membrane perturbers (91, 97). The membrane activity of the 14-mer peptide has been determined by fluorescence and ^{23}Na NMR spectroscopies. These studies revealed that the 14-mer peptide promotes the rapid release of calcein and Na^+ from vesicles, and hemoglobin from erythrocytes (97). On the other hand, previous results with pH-stat and single-channel measurement techniques have shown that the 21-mer peptide can span a bilayer membrane and act as an artificial ion channel, allowing the flow of ions through the bilayer (90, 91, 100, 101). These studies therefore indicate a high membrane activity for both peptides, making them very promising antimicrobial agents.

We have thus investigated in this study, by solid-state NMR and FTIR spectroscopies, the interactions between the 14-mer and 21-mer peptides and zwitterionic dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), DMPC/cholesterol, and anionic dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) model membranes that mimic eukaryote and bacterial cells. Experiments on magnetically oriented bicelles have also been performed to determine the effects of the 14-mer and 21-mer peptides on these oriented model membranes and to verify

the utility of bicelles for the determination of peptide orientation by ^{15}N NMR. Since the lipids found in natural membranes are in the fluid phase, the NMR results presented here have been obtained at temperatures above the lipid phase transition. The 14-mer and 21-mer peptides constitute very good models to study the membrane interaction of membrane active peptides since they are relatively small, can be chemically modified, and adopt an amphipathic helical structure that seems to be essential for the interaction with membranes. In addition, their neutral nature allows study of the effect of hydrophobic forces in the interaction with lipids without the influence of strong electrostatic interactions.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Materials

DMPC with protonated and deuterated (d_{54}) acyl chains, dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC), DMPG, and cholesterol were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and used without purification. Oxime resin was prepared by a standard procedure using polystyrene beads (100-200 mesh 1% DVB, Advanced ChemTech, Louisville, KY) (307). Resins with substitution levels around 0.5 mmol per gram of oxime group were used. Boc-protected amino acids were purchased from Advanced ChemTech. All solvents were Reagent, Spectro, or high-performance liquid chromatography-grade quality purchased commercially and used without any further purification except for dimethyl formamide (degassed with N_2), dichloromethane (distilled), and diethyl ether (distilled from sodium and benzophenone). Water used throughout the studies was distilled and deionized using a Barnstead NANOpurII system (Boston, MA) with four purification columns. All other reagents were purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI).

4.4.2 Peptide synthesis

The monoprotected 14-mer and diprotected 21-mer peptides (Figure 4.1) were synthesized and purified according to published procedures (90). For the 14-mer peptide, $n = 2$ and $X = OH$, and for the 21-mer peptide, $n = 3$ and $X = OCH_3$. Previous studies indicate that the monoprotected 14-mer peptide shows the greatest lytic activity, whereas the diprotected 21-mer peptide shows the greatest ion channel activity (E. Biron and N. Voyer, unpublished results).

4.4.3 Sample preparation: vesicles containing the 14-mer (21-mer) peptide

The DMPC, DMPG and DMPC/cholesterol lipid vesicles were prepared by mixing 20 mg (15 mg) of phospholipids in 80 μ L (60 μ L) of water, giving a total proportion of 20% (w/w) lipids in water. For the DMPC/cholesterol system, the lipids and cholesterol in a molar ratio of 7:3 were co-dissolved in chloroform, the solvent was evaporated under nitrogen gas, and the samples were put into vacuum overnight to remove all traces of organic solvent. In the three lipidic systems, the peptide was added to the lipids before the addition of water to give lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1, and the pH was ~ 6.5 in all samples. In the bicelle preparation, DHPC and DMPC were mixed in a molar ratio of 1:3.55 before sample hydration. The peptide was added after the bicelle formation and hydration in a lipid/peptide molar ratio of 60:1. The vesicle and bicelle samples then underwent at least three freeze (liquid N_2)/thaw (lipid phase transition temperature of $23^\circ C + 7^\circ C$)/vortex shaking cycles and were stored at $-20^\circ C$ until analysis. Three additional freeze/thaw/vortex cycles were performed on the samples before the acquisition of NMR and FTIR spectra. For 2H NMR analyses on both multilamellar vesicles and bicelles, an equimolar portion of lipids with deuterated acyl chains was used to replace the undeuterated lipids. Deionized and deuterium-depleted water were used for the ^{31}P and 2H NMR experiments, respectively. Deuterium oxide (D_2O) was used to eliminate the interference of water in the FTIR spectra. In all samples used in these NMR and FTIR

studies studies, the use of buffer was avoided to limit the interference of salts in the interaction of the peptides with model membranes.

4.4.4 NMR experiments

The static ^{31}P and ^2H NMR spectra were acquired with a Bruker Avance 300 MHz spectrometer (Bruker Canada, Milton, Ontario, Canada), whereas the static ^{31}P spectra of bicelles were acquired with a Bruker Avance 400 MHz spectrometer (Bruker Canada). For the static ^{31}P and ^2H NMR experiments, the samples were placed into a 5-mm coil of a homebuilt probe. For the static ^{31}P experiments performed at 400 MHz, the samples were placed into a 4-mm NMR tube inserted into a magic-angle spinning (MAS) probe. The ^{31}P NMR spectra were obtained at 121.5 MHz (300 MHz) and 161.9 MHz (400 MHz) using a phase-cycled Hahn echo pulse sequence (308) with TPPM proton decoupling (309). Using 2048 data points, typically 1200 scans were acquired with a pulse length of 4 μs , an interpulse delay of 30 μs , and a recycle delay of 4 s. A line broadening of 50 Hz was applied to all static ^{31}P spectra. The chemical shifts were referenced relative to external H_3PO_4 85% (0 ppm). The ^2H NMR experiments were carried out at 46.1 MHz (300 MHz) using a quadrupolar echo sequence (195). Using 4096 data points, 3200 scans were acquired with a 90° pulse length of 5 μs , an interpulse delay was 60 μs , and a recycle time of 500 ms. A line broadening of 100 Hz was applied to all spectra and the quadrupolar splittings were measured on dePaked spectra (310). An 1800-s equilibration delay was allowed between each temperature in the ^{31}P and ^2H experiments.

4.4.5 FTIR experiments

The infrared spectra were recorded with a Nicolet Magna 550 Fourier transform spectrometer (Thermo-Nicolet, Madison, WI) equipped with a narrow-band mercury-cadmium-telluride detector and a germanium-coated KBr beam splitter. A 10- μL amount of

the sample was placed between CaF₂ windows separated by a 6- μ m Mylar spacer. A total of 100 interferograms was acquired with a resolution of 2 cm⁻¹ in the spectral range of 4000-650 cm⁻¹ at various temperatures and controlled by a home-made device. The spectra were corrected for the water vapor and CaF₂ contribution by subtraction of a reference spectrum. The data was processed with the Grams 386 software (Galactic Industries Corporation, Salem, MA). The spectral region corresponding to the ester carbonyl stretching vibrations was baseline-corrected using a cubic function. The ester carbonyl region of the spectra was deconvolved using the method proposed by Griffiths and Pariente (233) with a narrowing factor (γ) of ~1.93, 1.73, and 1.63, and an apodization filter of 48%, 50%, 53%, for DMPC, DMPG, and DMPC/cholesterol vesicles, respectively, in the absence and presence of peptides.

4.5 Results and discussion

4.5.1 Solid-state NMR spectroscopy

4.5.1.1 Phosphorus-31 NMR

Since the phospholipid headgroup contains a phosphorus-31 atom with a 100% natural isotopic abundance, ³¹P NMR is a powerful technique to monitor changes occurring in the polar region of the bilayer (197, 198, 291). We have used ³¹P NMR spectroscopy to investigate changes occurring in the headgroup region of neutral and anionic multilamellar vesicles, and to bicelles upon addition of the 14-mer and 21-mer peptides. More specifically, static ³¹P solid-state NMR spectra provide information on the dynamics and/or orientation of the polar headgroup and on the vesicle morphology by analyzing the changes in chemical shift anisotropy (CSA) and spectral lineshape. In addition, ³¹P MAS experiments can be used to determine the effects of the peptides on the dynamics and/or orientation of the polar headgroup and on the shielding/deshielding of the phosphorus nucleus.

We first investigated the effects of the 14-mer and 21-mer peptides on zwitterionic DMPC membranes. The ^{31}P NMR static spectra and related spectral parameters are displayed in Figure 4.2(a) and Table 4.1.

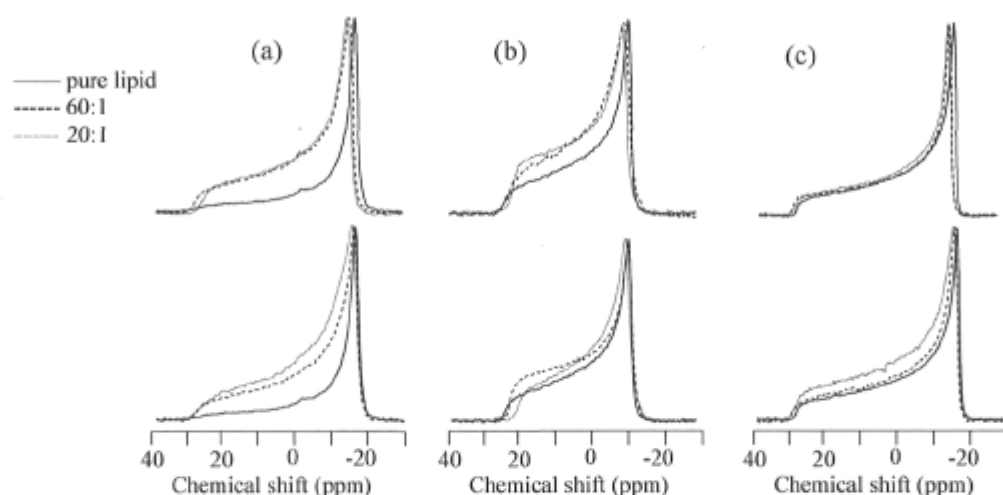


Figure 4.2: ^{31}P NMR spectra of (a) zwitterionic DMPC, (b) anionic DMPG, and (c) zwitterionic DMPC/cholesterol membranes at 37°C in the absence and presence of the 14-mer (*top row*) and 21-mer (*bottom row*) peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.

The spectra in the absence and presence of peptides are characteristic of a lamellar phase with axial symmetry (197). Upon peptide binding, a decrease in the DMPC CSA is observed for both peptides. More specifically, Table 4.1 shows that the CSA values (δ) of DMPC vesicles at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 (20:1) are decreased by 3.1 (4.6) ppm for the 14-mer peptide and by 0.7 (2.0) ppm for the 21-mer peptide. This decrease is more pronounced for the vesicles containing the 14-mer peptide than for those containing the 21-mer peptide, and in both cases could be attributed to a change in the dynamics and/or orientation of the lipid polar headgroup (197).

Picard et al. proposed another way to quantify the effect of peptides on the CSA by evaluating a relative order parameter of the form:

$$S_2 = \frac{\delta}{\delta_{ref}} \quad (4.1)$$

in which δ_{ref} is the CSA of a reference system, such as the pure lipid system in the absence of peptide (199, 200). The order parameter S_2 can vary from 1, for a system in which the dynamics is the same as that in the reference system, to 0 if the system becomes totally isotropic. As seen in Table 4.1, we obtained S_2 values of 0.91 (0.86) for the DMPC/14-mer peptide systems and 0.98 (0.94) for the DMPC/21-mer peptide system at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 (20:1). These S_2 values again confirm the more perturbing effect of the 14-mer peptide compared to the 21-mer peptide on the DMPC headgroup dynamics and/or orientation.

Table 4.1: ^{31}P NMR spectral parameters for membrane vesicles in the absence and presence of peptides at different molar ratios. Measurements were taken at 37°C for lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.

System	CSA (ppm)			S_1			S_2	
	Pure	(60:1) +14-mer +21-mer	(20:1) +14-mer +21-mer	Pure	(60:1) +14-mer +21-mer	(20:1) +14-mer +21-mer	(60:1) +14-mer +21-mer	(20:1) +14-mer +21-mer
DMPC	33.5	30.4 32.8	28.9 31.5	-0.17	-0.02 -0.06	-0.01 -0.05	0.91 0.98	0.86 0.94
DMPG	21.6	19.0 21.6	17.4 20.0	0.09	0.09 0.06	0.03 -0.03	0.88 0.99	0.81 0.92
DMPC/ Chol.	34.9	32.1 33.3	31.4 32.6	-0.05	0.01 -0.03	-0.00 -0.01	0.92 0.96	0.90 0.94

The second effect observed upon peptide binding is a change in the downfield edge intensity of the spectra. The spectra displayed in Figure 4.2(a) clearly show that the intensity of the downfield edge increases upon peptide binding and they are indicative of a greater 0° orientation of the lipid membranes relative to the external magnetic field (113). An order parameter (S_l) has been calculated to assess the level of orientation of the phospholipid membranes, as described by Picard et al. (199, 200). The first spectral moment (M_1) of ^{31}P NMR spectra is a good indicator of the orientation of a lipidic system with axial symmetry. This moment is related to S_l such as:

$$S_l = \frac{(M_1 - \delta_{iso})}{\delta} \quad (4.2)$$

where δ_{iso} is the isotropic chemical shift, and δ is the CSA defined by:

$$\delta = \delta_{||} - \delta_{iso} = -2\delta_{\perp} - \delta_{iso} \quad (4.3)$$

The perpendicular chemical shift (δ_{\perp}) can be obtained by measuring the chemical shift of maximum intensity at the 90° edge of the static ^{31}P NMR spectra. If $S_l = 1$, the lipid axis is oriented parallel to the magnetic field, whereas a value of -0.5 is characteristic of perpendicular alignment. Table 4.1 reveals S_l values of -0.17 for the pure DMPC system, -0.02 (-0.01) for the DMPC/14-mer peptide system, and -0.06 (-0.05) for DMPC/21-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 (20:1). These results indicate that the peptide-containing systems tend to orient in the magnetic field in a different way compared to the pure lipid system, the vesicles being less 90° oriented in the presence of peptides.

The ^{31}P NMR spectra of the DMPG vesicles containing the 14-mer and 21-mer peptides are displayed in Figure 4.2(b). As in the case of the DMPC vesicles, these spectra indicate that the 14-mer and 21-mer peptides both reduce the CSA at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1. As shown in Table 4.1, the CSA values of the DMPG vesicles containing the 14-mer and 21-mer peptides are decreased by 2.6 (4.2) ppm and by 0.0 (1.6)

at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 (20:1). This is also confirmed by the calculation of the S_2 order parameter as shown in Table 4.1. For the vesicles containing the 14-mer and the 21-mer peptides, the S_2 values obtained are 0.88 (0.81) and 0.99 (0.92) at a molar ratio of 60:1 (20:1). Even if the intensity of the component at 0° is greater upon peptide binding, the S_I order parameters obtained for the DMPG vesicles containing the 14-mer and 21-mer peptides indicate that the orientation of the DMPG vesicles is not significantly affected by the presence of peptides. In fact, as shown in Table 4.1, vesicles containing the 14-mer peptide have an S_I of 0.09 (0.03), whereas vesicles with the 21-mer peptide have an S_I of 0.06 (-0.03) at a lipid-to-peptide molar ratio of 60:1 (20:1), compared to the S_I value of 0.00 for the pure DMPG vesicles.

As depicted in Figure 4.2(c) and listed in Table 4.1, the CSA of the DMPC/cholesterol vesicles containing the peptides at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 (20:1) is reduced by 2.8 (3.5) ppm in the presence of the 14-mer peptide and by 1.6 (2.3) ppm in the presence of the 21-mer peptide. At a lipid/peptide molar ratio of 60:1 (20:1), the S_2 order parameter is 0.92 (0.90) in the presence of the 14-mer peptide and 0.96 (0.94) in the presence of the 21-mer peptide. The calculation of the S_I order parameter reveals that, unlike with the DMPC vesicles, both peptides do not perturb significantly the orientation of the system in the magnetic field. This is in agreement with previous studies indicating that cholesterol molecules stabilize the bilayer in such a way that their hydrocarbon framework and the alkyl chain are inserted in the hydrophobic core, whereas their hydroxyl group is in the vicinity of the lipid ester carbonyl groups (109).

The decrease of the CSA observed in DMPC, DMPG and DMPC/cholesterol vesicles upon the addition of the 14-mer peptide could be explained by an interaction of the peptide at the polar headgroup. As illustrated in Figure 4.1(b), the strategic positioning of the crown ethers at sites 2, 6, 9, and 13 for the 14-mer peptide, and sites 2, 6, 9, 13, 16, and 20 for the 21-mer peptide makes all the crown ethers well sequestered on one side of the α -helix. This confers an amphipathic nature to the peptides, and when inserted in a bilayer, the crown ethers are facing the aqueous phase, whereas the hydrophobic helix is facing the

hydrophobic region of the bilayer. This interfacial interaction could result in a change in the dynamics and/or orientation of the polar headgroup. Bonev et al. have reported a decrease of the CSA of membranes composed of DMPC and sphingomyelin (10% mol) upon equinatoxin II addition, and they attributed this decrease to a perturbation of the lipid headgroup packing (279). Huster et al. studied the colicin Ia channel in interaction with palmitoyloleoylphosphatidylcholine/palmitoyloleoylphosphatidylglycerol vesicles and they concluded that colicin Ia interacts with the lipid bilayer since a smaller ^{31}P CSA was obtained (280). Several other groups have also performed ^{31}P NMR experiments on antimicrobial and human peptides (281-283).

The 21-mer peptide has a similar but less pronounced effect on the three lipidic systems. This could be explained by a different mode of interaction between the 14-mer and the 21-mer peptides since both peptides do not have the same length. Considering the peptides as ideal α -helices, the lengths of the 14-mer and the 21-mer peptides are 21.0 Å and 31.5 Å, respectively. Since the mean hydrophobic length of DMPC in the fluid phase is ~ 28.5 Å (311), the hydrophobic mismatch could play a role in the membrane topology and thus explain the differences observed between the 14-mer and the 21-mer peptides. In fact, considering the difference in length between the 14-mer peptide and the DMPC bilayers in the fluid phase, a hydrophobic mismatch of 7.5 Å could allow the 14-mer peptide to adopt preferentially a surface orientation, whereas the smaller mismatch of 3.0 Å between the 21-mer peptide and the DMPC bilayers could, but not exclusively, favor a transmembrane orientation.

Another interesting phenomenon observed in the spectra presented in Figure 4.2(a) is the change in the downfield intensity of the spectra upon peptide binding. The ^{31}P NMR spectrum of the pure DMPC vesicles shows a partial alignment in the magnetic field. This behavior has already been reported and is related to the anisotropy in the diamagnetic susceptibility $\Delta\chi$ of the phospholipids (113). With a negative $\Delta\chi$, the lipid molecules tend to align their long axis perpendicular to the magnetic field. The facility by which vesicle deformation occurs in the magnetic field is a function of parameters such as the membrane

shape, elasticity, curvature, fluidity, viscosity and the strength of the magnetic field (115). By analyzing the spectral shape of DMPC, DMPG and DMPC/cholesterol spectra, we note that DMPC vesicles are more susceptible to deformation in the magnetic field compared to DMPG and DMPC/cholesterol vesicles. The repulsive charges at the polar headgroup of DMPG molecules, as well as the stabilizing effect of the cholesterol molecules, could explain their relative spherical shape compared to the ellipsoidal shape of DMPC vesicles in the magnetic field (109, 303, 312).

An increase in the intensity of the downfield edge is observed upon addition of the two peptides. Two hypotheses could explain this change in the morphology of the vesicles, and they are well described by Pott et al. (302). Firstly, the binding of the peptide to the bilayer could result in a change of the membrane elastic properties, resulting in less deformable vesicles. Secondly, this deformation could result from a change of the membrane magnetic susceptibility. In fact, most of the helical peptides and proteins possess a large and positive diamagnetic susceptibility due to the peptide bond, and the helix therefore tends to align its long axis parallel to the magnetic field (118). If a helix is bound to the bilayer with its axis parallel to the bilayer plane, a greater 90° orientation is expected. A similar case has been reported by Neugebauer et al. in the study of magnetic orientation of membranes by bacteriorhodopsin using optical measurements and neutron scattering (117). In our case, however, despite the presence of helical peptides, an opposite effect is observed on the magnetic orientation of the DMPC membranes. This observation could be explained by the presence of phenylalanine residues which contain an aromatic ring whose plane is aligned perpendicular to the helix axis. According to Worcester (118), in such an arrangement, the diamagnetic susceptibility of the aromatic rings will tend to align their planes parallel to the magnetic field, which could partially overcome the perpendicular orientation of the phospholipids.

Finally, the magnetic orientation of bicelles in the presence of the 14-mer and 21-mer peptides was investigated. Such an experiment is of great interest since bicelles represent a good way to orient peptides in the magnetic field and to take advantage of the

information contained in orientation-dependent anisotropic interactions. As previously reported, bicelles are discoid bilayers or perforated lamellae that spontaneously orient with their normal perpendicular to the magnetic field (134, 136, 176). At temperatures in the range of bicelle existence, two resonances are seen. As described in previous reports, the most upfield and intense resonance is attributed to molecules (mostly DMPC) located in the planar section of the bicelles and aligned perpendicular to the direction of the magnetic field (136, 199). The downfield resonance is attributed to molecules (mostly DHPC) on the highly curved region of the bicelle torus or pore (153, 199). ^{31}P static NMR spectra and related spectral parameters of peptide-containing bicelles are shown in Figure 4.3 and in Table 4.2. A lipid/peptide molar ratio of 60:1 was used and the spectra were recorded at 33°C.

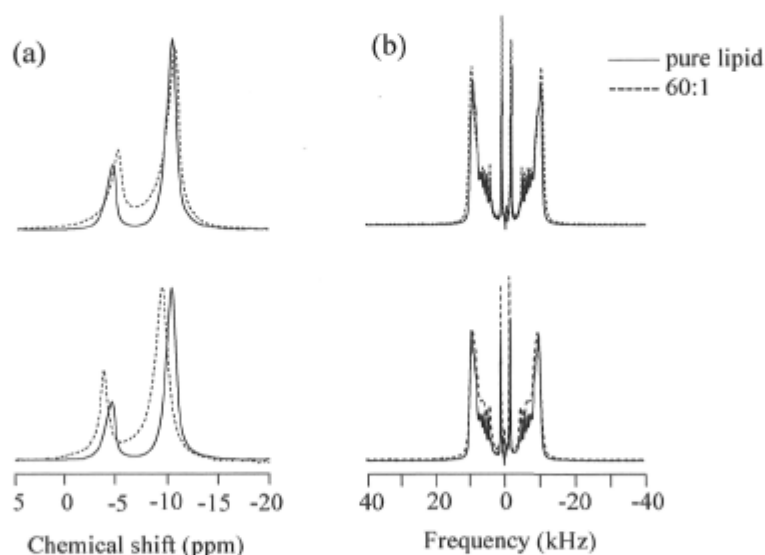


Figure 4.3: (a) ^{31}P static and (b) ^2H NMR spectra of bicelles at 33°C in the absence and presence of the 14-mer (*top row*) and 21-mer (*bottom row*) peptides at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

The integrity of the bicellar system appears to be preserved when the 14-mer and 21-mer peptides are added, since not only the spectra are typical of well-aligned bicelles, but the samples are optically clear. As mentioned previously, the sharp resonances at -4.5

ppm and -10.4 ppm are associated with the phosphorus atom present in the DHPC and DMPC headgroups and the linewidth is 1.1 ppm for both resonances. Upon the addition of the 14-mer peptide, the resonances of DHPC and DMPC are upfield shifted to -5.1 ppm and -10.6 ppm, respectively, and slightly broadened (1.5 ppm). In addition, the temperature range in which the bicelles align is not significantly changed in the presence of the 14-mer peptide (data not shown). Upon the addition of the 21-mer peptide, the DHPC and DMPC resonances are downfield shifted to -4.0 ppm and -9.5 ppm, respectively, and the linewidth is slightly changed, i.e., 0.7 ppm for DHPC and 1.3 ppm for DMPC. The temperature range in which the bicelles align is increased by 5 degrees in the presence of the 21-mer peptide (data not shown).

Table 4.2: ^{31}P NMR spectral parameters of bicelles in the absence and presence of peptides. Measurements were taken at 33°C for a lipid/peptide molar ratio of 60:1. FWHM, full width at half-maximum.

System	DHPC (δ , ppm)	DHPC (FWHM, ppm)	DMPC (δ , ppm)	DMPC (FWHM, ppm)
Bicelles	-4.5	1.1	-10.4	1.1
+14-mer	-5.1	1.5	-10.6	1.5
+21-mer	-4.0	0.7	-9.5	1.3

The changes in chemical shifts observed for the DHPC and DMPC resonances in bicellar systems containing the peptides are more pronounced for the 21-mer peptide than for the 14-mer peptide. The upfield (downfield) shifts of the DHPC and DMPC resonances in the presence of the 14-mer (21-mer) peptide could both originate from a modification of the phosphorus atom environment upon interaction of the phospholipid headgroups with shielding (deshielding) moieties of the 14-mer (21-mer) peptides. In such cases, changes in the lipid isotropic chemical shift (δ_{iso}) are expected. The changes observed in the bicelle ^{31}P NMR spectra could also be due to changes in the mobility of the phospholipids, as well as the headgroup orientation. To verify the first hypothesis, we performed ^{31}P MAS NMR experiments on the bicellar system (data not shown). No change in the isotropic chemical shift (δ_{iso}) is observed when the peptides are added to the bicellar system. The lipid

resonance linewidth is also unchanged when both peptides are added. Therefore, the chemical shift variation observed for both the DMPC and DHPC resonances induced by the interaction with both peptides cannot be attributed to a change in the phosphorus nucleus environment, but is most likely due to a small ordering (disordering) of the phosphate group by the 14-mer (21-mer) peptide or to a change in the headgroup orientation. As shown in Figure 4.3(a) (*top row*), the shape of the resonances is slightly distorted by the presence of the 14-mer peptide but the sample is still clear. This could be explained by a small change in the magnetic orientation of the bicelles upon peptide binding. These results on the bicellar systems are in agreement with those obtained for the vesicular systems. Upon the 21-mer peptide addition, the spectra in Figure 4.3(a) (*bottom row*) show that the 21-mer peptide does not greatly affect the shape of the resonance, but affect to a greater extent the orientation of the polar headgroup, since a large change in the CSA is observed. The effect of the 21-mer peptide on the bicelles is therefore most likely not attributed to a destabilizing effect of the polar headgroup but to a change in its orientation in the magnetic field. These results could explain the fact that the temperature range of bicelle alignment is unperturbed (increased) in the presence of the 14-mer (21-mer) peptides, since both peptides perturb the bicellar system to different extents.

In light of these results, it appears that both peptides interact in a different manner with bicelles, the 14-mer peptide slightly destabilizing the bicellar system, whereas the 21-mer peptide appears to have a pronounced effect on the polar headgroup orientation. Similar results were obtained by Marcotte et al., who studied the interaction of the neuropeptide methionine-enkephalin (Menk) with modified bicelles (Bic/PG and Bic/PS) (301) and attributed the differences observed in Bic/PG and Bic/PS to a different location of the peptide at the interfacial region of the bilayer. Our results therefore suggest that the 14-mer and 21-mer peptides have different membrane topologies in bicelles.

4.5.1.2 Deuterium NMR

We investigated the effect of the 14-mer and 21-mer peptides on the hydrophobic region of zwitterionic DMPC and DMPC/cholesterol systems, as well as bicelles, by ^2H NMR spectroscopy. This is achieved by using phospholipids with deuterated acyl chains. The deuteration of the lipid acyl chains does not significantly alter the properties of the membrane arrangement except for the main phase transition temperature, which is decreased by $\sim 3\text{-}5^\circ\text{C}$ (313). It is thus possible to determine variations in the lipid chain order by monitoring changes in the quadrupolar splitting ($\Delta\nu_Q$) values. The increase (decrease) in $\Delta\nu_Q$ for a C-D bond in a lipid bilayer system with axial symmetry is associated to order (disorder) in the deuterated chains and is related to an order parameter S_{CD} :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} (3 \cos^2 \theta - 1) S_{CD} \quad (4.4)$$

where ($e^2 q Q/h$) is the quadrupole coupling constant for C-D bonds (~ 167 kHz) and θ is the angle between the bilayer normal and B_0 (291). We investigated both the plateau ($\Delta\nu_P$) and the terminal methyl ($\Delta\nu_M$) regions of the lipid acyl chains (314).

The ^2H NMR spectra obtained for the DMPC vesicles in the absence and the presence of the 14-mer and 21-mer peptides are shown in Figure 4.4(a). As also observed by static ^{31}P NMR, the spectral lineshapes are typical of lipids in the fluid phase. As illustrated in Figure 4.4(a) (*top row*) for the DMPC/14-mer vesicles, there is no significant change of $\Delta\nu_Q$ (kHz) at a lipid/peptide molar ratio of 60:1. However, at a molar ratio of 20:1, there is a slight increase in the quadrupolar splitting $\Delta\nu_P$ at the plateau region. As listed in Table 4.3, the $\Delta\nu_P$ is increased by 1.3 kHz at a lipid/peptide molar ratio of 20:1. This is reflected by an S_{CD} order parameter of 0.21 compared to the pure DMPC vesicles with an S_{CD} of 0.20. On the other hand, the spectra shown in Figure 4.4(a) (*bottom row*)

indicate that the 21-mer peptide does not perturb the acyl chain ordering of DMPC at either of the lipid-to-peptide molar ratios used in this study since no significant changes in the quadrupolar splitting $\Delta\nu_Q$ and S_{CD} values are observed (Table 4.3).

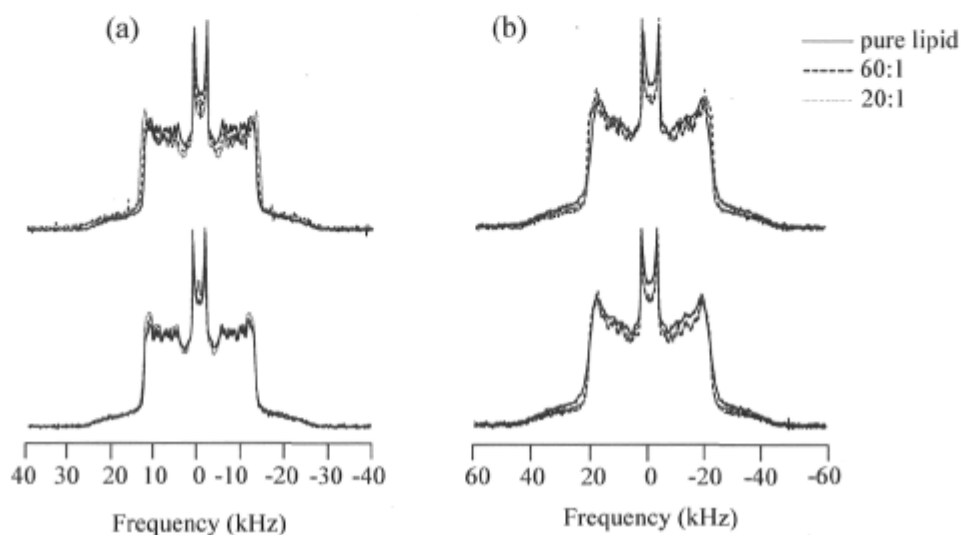


Figure 4.4: ^2H NMR spectra of the zwitterionic (a) DMPC and (b) DMPC/cholesterol membranes at 37°C in the absence and presence of the 14-mer (*top*) and 21-mer (*bottom*) peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.

The ^2H NMR spectra of the DMPC/cholesterol vesicles in the absence and presence of the 14-mer and 21-mer peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1 are presented in Figure 4.4(b). As illustrated in Figure 4.4(b) (*top row*), there is an increase in the quadrupolar splitting at the plateau region in DMPC/cholesterol vesicles containing the 14-mer peptide. The $\Delta\nu_p$ of the DMPC/cholesterol/14-mer peptide system at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1 are 43.2 kHz and 42.0 kHz, compared to 39.7 kHz for the pure DMPC/cholesterol system. This increased order is also reflected in the calculation of the S_{CD} parameter with values of 0.34 (0.33) for a molar ratio of 60:1 (20:1), compared to an S_{CD} of 0.31 for the pure system. The effect of the 21-mer peptide on the hydrophobic

core of the DMPC/cholesterol vesicles is represented in the spectra of Figure 4.4(b) (*bottom row*). As observed on the spectra, there is an increase of the quadrupolar splitting at the plateau region, the $\Delta\nu_P$ being 41.1 (41.0) kHz at a lipid/peptide molar ratio of 60:1 (20:1). The S_{CD} values at the plateau region also reflect this tendency, varying from 0.31 for the pure system to 0.32 at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1. On the other hand, the results shown in Figure 4.4 indicate that the 14-mer and 21-mer peptides do not have any significant effect on the methyl region in either lipid system.

Table 4.3: Quadrupolar splittings and S_{CD} order parameters of DMPC- d_{54} for the plateau and methyl regions in DMPC and DMPC/cholesterol systems. Measurements were taken at 37°C in the absence and presence of the 14-mer and 21-mer peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1. The quadrupolar splittings have been measured on dePaked spectra (310).

System	$\Delta\nu_P$ ($\Delta\nu_M$) (kHz)			$S_{CD(p)}$ ($S_{CD(m)}$)		
	Pure	(60:1)	(20:1)	Pure	(60:1)	(20:1)
		+14-mer	+14-mer		+14-mer	+14-mer
		+21-mer	+21-mer		+21-mer	+21-mer
DMPC	25.6 (3.3)	25.9 (3.4) 25.6 (3.2)	26.9 (3.7) 25.5 (3.2)	0.20 (0.03)	0.20 (0.03) 0.20 (0.03)	0.21 (0.03) 0.20 (0.03)
DMPC/ Chol.	39.7 (5.8)	43.2 (6.6) 41.1 (5.9)	42.0 (6.3) 41.0 (5.9)	0.31 (0.05)	0.34 (0.05) 0.32 (0.05)	0.33 (0.05) 0.32 (0.05)

The results obtained in ^2H NMR experiments for the 14-mer peptide in DMPC and DMPC/cholesterol vesicles suggest that the peptide is located at the surface of the bilayer in both systems, but appears to be closer to the interface in the DMPC/cholesterol system than in DMPC, since a greater increase in the $\Delta\nu_Q$ of the plateau region is observed for the DMPC/cholesterol system. Similar observations have been made by Dufourc et al. who investigated the interaction of melittin with phospholipid membranes (293). They observed that the melittin location in the bilayer depends on the temperature and thus the fluidity of the bilayer. More specifically, they attributed an ordering of the acyl chains to a location of melittin at the surface of the bilayer, capping the lipid headgroups and leading to a greater chain packing. A deeper insertion of melittin in the bilayer results in a disordering effect of the hydrophobic core. Henzler-Wildman et al. observed the same temperature dependence

of the degree of insertion with the human antimicrobial peptide LL-37 (300). Since the cholesterol molecule is located in the hydrophobic core of the bilayer, it could prevent the insertion of the 14-mer peptide in the bilayer, sequestering the peptide at the surface and then enhancing its capping effect at the polar headgroup and its ordering effect on the lipid acyl chains.

Interesting points of view are reported in the literature concerning the formation of rich- and poor-cholesterol domains and the influence of such domains in lipid-peptide interactions. In particular, it has been suggested that amidated pardaxin induces the formation of rich- and poor-cholesterol domains and that it interacts preferentially with poor-cholesterol regions (315). Pokorny et al. observed a similar behavior with the δ -lysin peptide that preferentially binds to eukaryotic cells and strongly interact with liquid-disordered domains poor in cholesterol (316). These studies indicate that cholesterol reduces the ability of the peptides to disrupt rich-cholesterol domains, whereas peptides accumulate in poor-cholesterol domains, where they disrupt the lipid bilayer.

As seen in the spectra presented in Figure 4.4(a) (*bottom row*), no change is observed on the packing of the DMPC acyl chains in the presence of the 21-mer peptide. This observation could be explained either by a transmembrane orientation of the peptide, since the hydrophobic lengths of the lipid bilayer and the peptide are approximately identical or by a location of the peptide at the bilayer surface with no direct effect on the acyl chain ordering. De Planque et al. studied a series of synthetic peptides of different lengths with model membranes of varying acyl chain lengths and concluded that a hydrophobic match between the bilayer and the peptide results in a nonperturbed bilayer, since no adjustment has to be made to compensate for hydrophobic mismatch (289, 294). In addition, spectral simulations performed by Belohorcova et al. indicate that a membrane-spanning peptide has little effect on lipid chain order if its hydrophobic length closely matches the lipid hydrophobic thickness (295). On the other hand, the results obtained by Banerjee et al. on the antimicrobial peptide alamethicin are very similar to those obtained with the 21-mer peptide (282). In fact, they also observed a change in the dynamics and/or

orientation at the polar headgroup of the lipid molecules without any change in the quadrupolar splitting. They associated these observations to an interaction of the peptide near the interface of the bilayer.

In the presence of cholesterol, the hydrophobic thickness of the bilayer increases by $\sim 5.0 \text{ \AA}$ (312). If we suppose a transmembrane orientation for the 21-mer peptide in DMPC bilayers, this membrane topology is susceptible to change by the presence of cholesterol, which rigidifies the hydrophobic core of the bilayer and makes the bilayers less flexible and elastic. A surface orientation of the 21-mer peptide is possible since cholesterol makes the bilayer more rigid and the 21-mer peptide less susceptible to penetrate the DMPC/cholesterol vesicles. If the 21-mer peptide is oriented at the bilayer surface like the 14-mer peptide, it could cap the lipid headgroups and increase the acyl chain packing. A change in membrane orientation could be observed for peptides that do not have the required length to closely span a lipid bilayer without hydrophobic mismatch, as reported by Bechinger and Nezil (298, 317).

We have also performed ^2H experiments on perdeuterated bicelles containing the 14-mer and 21-mer peptides to support the previous ^{31}P NMR results. The spectra shown in Figure 4.3(b) are typical of aligned bilayers with the normal perpendicular to the magnetic field, with well-resolved resonances for most of the deuterium positions. The addition of the 14-mer peptide (Figure 4.3(b) (*top row*)) results in a small increase of the quadrupolar splitting (0.3 kHz) but the deuterium resonances are still well resolved. This is consistent with the increase of the quadrupolar splitting observed in DMPC vesicles upon peptide binding. A surface location of the 14-mer peptide in bicelles could explain both the ^{31}P and ^2H NMR results. In fact, a surface location could cap the polar headgroup and stabilize the hydrophobic region of the bicelles while perturbing the choline headgroup dynamics and/or orientation. The spectra of the bicelles in the absence and presence of the 21-mer peptide are shown in Figure 4.3(b) (*bottom row*). As with the 14-mer peptide, the addition of the 21-mer peptide does not perturb the bicelle orientation. In addition, there is no significant change in the quadrupolar splitting. However, unlike the 14-mer peptide-containing

bicelles, the deuterium resonances are broadened upon 21-mer peptide binding. This could originate from a decrease of the T_2 relaxation time that could be due to a transmembrane orientation of the peptide. This is consistent with the stabilizing effect of the 21-mer peptide on bicelles as revealed by the ^{31}P static NMR spectra.

4.5.2 Fourier transform infrared spectroscopy

Since the different molecular groups composing the phospholipids vibrate at different frequencies, FTIR spectroscopy is a useful tool for probing several regions of the bilayer simultaneously. In this study, we investigated the interfacial region of the lipid bilayers by monitoring the ester carbonyl stretching mode in the spectral region 1700-1750 cm^{-1} . The carbonyl stretching mode has been extensively described by Mendelsohn and Mantsch (228), Blume et al. (231), Mantsch and McElhaney (227), and was reviewed more recently by Tamm and Tatulian (229) and Lewis and McElhaney (230). Deconvolution of the broad C=O stretching band centered at $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$ reveals the superposition of two narrower bands at 1742 and 1728 cm^{-1} . The high frequency band is associated to the nonhydrogen-bonded carbonyl groups, whereas the band at 1728 cm^{-1} corresponds to the hydrogen-bonded carbonyl groups (227, 230, 231).

FTIR was used in this study to investigate the effect of the peptides occurring at the polar/apolar interface of the bilayer by monitoring changes in the ester carbonyl stretching intensities of the deconvolved band at 1742 and 1728 cm^{-1} in the infrared spectra as a function of the concentration of the 14-mer and the 21-mer peptides at temperatures below (15°C) and above (50°C) the main phase transition. For DMPC and DMPG phospholipids, the main phase transition occurs at 23°C, and cholesterol is known to attenuate this phase transition (318, 319).

The deconvolved FTIR spectra of the phospholipid carbonyl stretching mode of DMPC, DMPG, and DMPC/cholesterol vesicles are displayed in Figure 4.5. At

temperatures above the gel-to-fluid phase transition temperature, the DMPC and DMPG bilayers are more hydrated compared to the DMPC/cholesterol system. For DMPC and DMPG, this is reflected by a more intense band at 1728 cm^{-1} characteristic of hydrogen-bonded ester carbonyls, and this is consistent with the looser packing of the lipids in the fluid phase and a greater access of water molecules to the ester carbonyls (105, 230). However, the band at 1728 cm^{-1} in DMPC/cholesterol vesicles is still less intense in comparison to the one at 1742 cm^{-1} even if the sample is heated to 50°C . This behavior indicates that the location of the cholesterol molecules in the lipid bilayer decreases the hydration of the carbonyl groups. The spectral lineshapes also indicate that the DMPG vesicles are less hydrated than the DMPC and DMPC/cholesterol systems at 15°C . Above the phase transition temperature however, the DMPC and DMPG vesicles become well hydrated since the intensity of the 1728 cm^{-1} band is greater than that of the 1742 cm^{-1} band.

The effects of the 14-mer and 21-mer peptides on the hydration profile of the DMPC, DMPG, and DMPC/cholesterol systems below and above the gel-to-fluid phase transition temperature are shown in Figure 4.5. For the DMPC/14-mer vesicles at a lipid/peptide molar ratio of 60:1, there are no changes in the spectral lineshape or in the intensity of the components at 1742 cm^{-1} and 1728 cm^{-1} at either temperature. However, there is a broadening of the band at 1728 cm^{-1} at a lipid/peptide molar ratio of 20:1. This suggests that the lipid molecules in interaction with the 14-mer peptide undergo greater motion than the pure lipid molecules (320) but that the hydrogen bonding of the carbonyl groups does not seem to be perturbed. Arrondo et al. have reported a similar effect of glycophorin on DPPC membranes, which they attributed to an increase of lipid motion in the presence of the protein (234). A similar effect is observed for the DMPC/21-mer vesicles, as shown in Figure 4.5(d). At 15°C , there is a broadening of the band at 1728 cm^{-1} , whereas both bands are broadened at 50°C , suggesting that the lipid molecules undergo rapid molecular motion in the bilayer with no change in the hydrogen-bonding pattern. These results suggest that the 14-mer and 21-mer peptides make the polar region of the

DMPC molecules more mobile upon peptide binding. This is consistent with the decrease of the CSA observed for both peptides in ^{31}P NMR spectra of DMPC vesicles.

The spectra of the DMPG/14-mer vesicles shown in Figure 4.5(b) indicate that there are no significant changes in the relative intensities of the 1742 cm^{-1} and 1728 cm^{-1} bands either below or above the phase transition temperatures. Very similar results are also obtained for the DMPG/21-mer vesicles, as shown in Figure 4.5(e). These results indicate that there is no significant change in the hydrogen-bonding profile of the DMPG vesicles upon peptide binding at molar ratios of 60:1 and 20:1 and at temperatures below and above the lipid phase transition. Marcotte et al. obtained very similar results with the neuropeptide Menk in interaction with DMPG vesicles (321). More specifically, they observed no change in the hydrogen bonding profile, whereas a reduction in the CSA was seen on the DMPG ^{31}P NMR spectra. These results were attributed to a surface location of Menk in DMPG vesicles.

The FTIR spectra of the DMPC/cholesterol/14-mer system are shown in Figure 4.5(c). At 15°C , there are no significant changes in the 1728 cm^{-1} and 1742 cm^{-1} bands upon the 14-mer peptide binding at molar ratios of 60:1 and 20:1. Upon sample heating, there is a shift of the band to lower frequencies and the component at 1728 cm^{-1} becomes more intense. According to Lewis et al., this shift to lower frequencies could be attributed to a decrease in the polarity of the environment around the ester carbonyl groups (232). Figure 4.5(f) illustrates the case of the DMPC/cholesterol/21-mer system. At 15°C and at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1, there is a slight narrowing of the component at 1742 cm^{-1} and no significant change for the component at 1728 cm^{-1} . The narrowing could be explained by a decrease in the motion of lipid molecules upon peptide binding. As the temperature is raised until it reaches 50°C , the intensity of the component at 1728 cm^{-1} increases and becomes identical to that at 1742 cm^{-1} . In summary, the 14-mer peptide reduces the polarity of the environment and favors the formation of hydrogen bonds at the ester carbonyl groups. The 21-mer peptide reduces the mobility of the lipid molecules and also favors the formation of hydrogen bonds to the ester carbonyl groups. Since the

component at 1728 cm^{-1} is more broadened in the presence of the 14-mer peptide compare to that in the presence of the 21-mer peptide, the 14-mer peptide seems to increase to a greater extent the mobility of the polar region of the lipid molecules, again supporting the data obtained by ^{31}P NMR spectra, which showed a more pronounced effect of the 14-mer peptide on the dynamics and/or orientation of the DMPC headgroups compared to the effect of the 21-mer peptide.

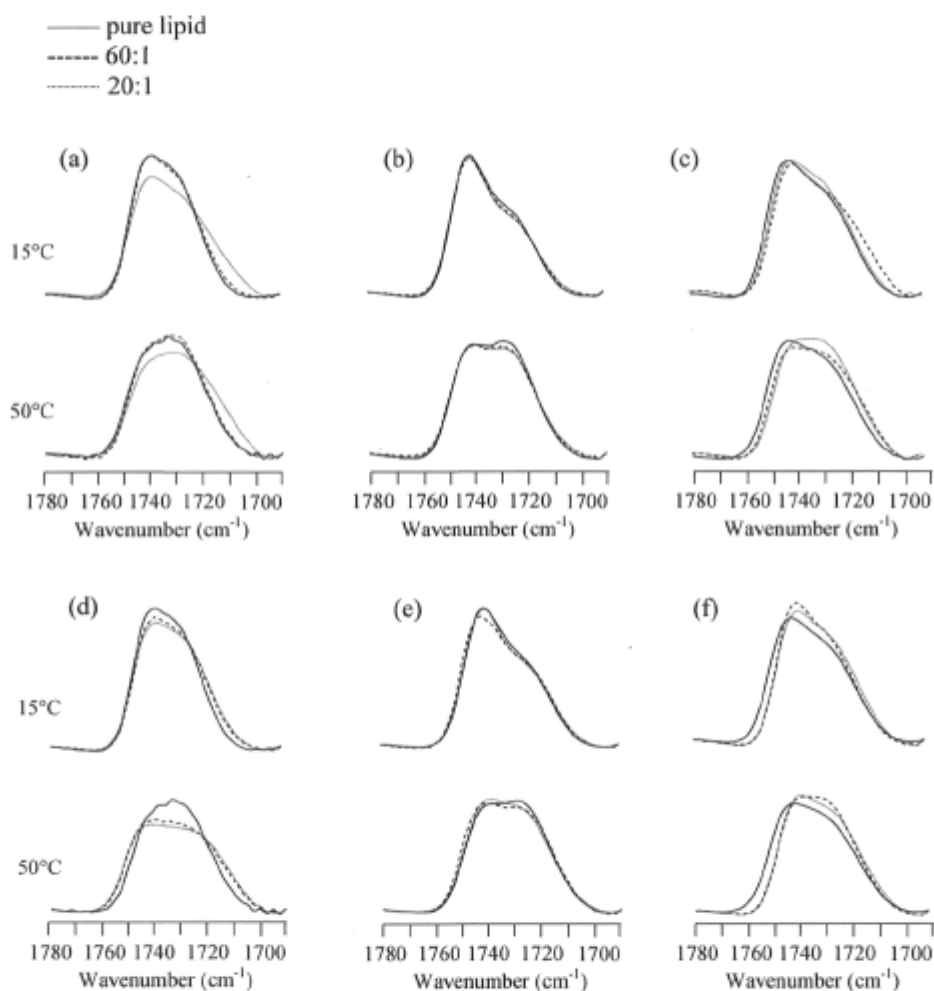


Figure 4.5: FTIR spectra of the C=O stretching bands of zwitterionic and anionic membranes at 15°C and 50°C: (a-d) DMPC, (b-e) DMPG and (c-f) DMPC/ cholesterol vesicles in the absence and presence of the 14-mer (*top*) and 21-mer (*bottom*) peptides at lipid/peptide molar ratios of 60:1 and 20:1.

4.5.3 Proposed mechanisms of membrane perturbation

The aim of this study was to shed light on the interactions between synthetic amphipathic peptides and model membranes. A better understanding of such interactions is very important for the design of active antimicrobial peptides with the desired specificity against bacteria. We have studied the interactions of synthetic 14-mer and 21-mer peptides with DMPC, DMPC/cholesterol, and DMPG vesicles, and with bicelles, by varying the lipid/peptide molar ratio. Solid-state NMR and Fourier transform infrared spectroscopies have been shown to be very useful to probe the effects of the 14-mer and 21-mer peptides at three different regions of the bilayer, namely the polar headgroup, the interfacial region and the hydrophobic core. Based on these results, mechanisms of interaction between the 14-mer and 21-mer peptides and model membranes are proposed below. More specifically, since the perturbing effect induced by the peptide binding to the bilayer is more pronounced for the 14-mer peptide than for the 21-mer peptide, we suggest different modes of interaction between these peptides and lipid bilayers.

The effect of the 14-mer peptide on the dynamics and/or the orientation of the polar headgroup has been shown to be slightly more pronounced on DMPC than on DMPG. The morphology of the DMPC vesicles is also affected to a greater extent than that of the DMPG and DMPC/cholesterol vesicles. The polar headgroups of bicelles are slightly destabilized by the 14-mer peptide, since the shape of the DHPC and DMPC resonances are slightly modified. As shown by ^2H NMR experiments on DMPC vesicles, the 14-mer peptide induces order in the hydrophobic core of the bilayer, and the presence of cholesterol increases this ordering effect. At the interfacial region of DMPC vesicles, the lipid molecules in interaction with the 14-mer peptide undergo rapid motions, but the hydrogen-bonding pattern at the ester carbonyl is not modified. In the DMPC/cholesterol vesicles, the interfacial region is less exposed to a polar environment and more intermolecular hydrogen bonds are created with the surrounding water molecules at the ester carbonyl groups.

Combined with previous calcein and ^{23}Na leakage studies done by fluorescence and NMR (97), our results strongly suggest that the 14-mer peptide interacts at the bilayer surface with an in-plane orientation. The inverse-cone shape of the 14-mer peptide could explain the perturbation induced in the bilayer upon peptide binding. According to Epanand et al., this peptide belongs to the structural class A, in which the region occupied by the hydrophilic part on the amphipathic helix is larger than the hydrophobic region, and this shape is recognized as inducing positive curvature in the bilayer (251). Such an effect has been reported by Ramamoorthy et al., who studied the disruption of the lipid bilayer induced by an analog of magainin, MSI-78 (296). The induction of a positive curvature by the 14-mer peptide is also supported by a net decrease of calcein leakage of vesicles composed of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine lipids (97). More specifically, the cone shape of the phosphatidylethanolamine lipids counterbalances the inverse-cone shape of the 14-mer peptide, therefore inhibiting the positive curvature imposed on the lipid bilayer. The presence of cholesterol only affects the surface interaction of the peptide with the polar headgroups.

The results obtained by ^{31}P NMR experiments indicate that the 21-mer peptide has an effect on the dynamics and/or orientation of the DMPC headgroups, and the presence of cholesterol does not perturb this pattern. The morphology of the DMPC vesicles is also affected by peptide binding. At a lipid/peptide molar ratio of 60:1, the dynamics and/or orientation of the DMPG polar headgroup are not affected. The 21-mer peptide has a pronounced stabilizing effect on bicelles, since the temperature range of orientation is increased. The order of the DMPC acyl chains in the DMPC system is not significantly affected upon peptide binding, whereas it is slightly increased in the DMPC/cholesterol system. The hydrogen-bonding patterns of the DMPC and DMPG systems are very similar to those obtained with the 14-mer peptide, whereas in DMPC/cholesterol vesicles, the presence of the 21-mer peptide increases the number of hydrogen bonds at the ester carbonyl groups. Even though previous single-channel measurements and attenuated total reflectance experiments suggest a partial transmembrane alignment for the 21-mer peptide

in DMPC bilayers (91, 100, 101), we still cannot draw conclusions about the exact membrane topology of the 21-mer peptide in lipid bilayers.

4.6 Conclusions

In this study, we investigated the interactions between synthetic amphipathic peptides and model membranes by solid-state NMR and FTIR spectroscopies. The model membranes investigated include zwitterionic vesicles composed of DMPC and DMPC/cholesterol, anionic DMPG vesicles, and DMPC/DHPC bicelles. The results obtained by ^{31}P and ^2H NMR, and by FTIR spectroscopy, suggest that the 14-mer peptide is located at the bilayer surface of DMPC, DMPG, and DMPC/cholesterol vesicles. Our results also indicate that the presence of cholesterol confines the peptide closer to the surface of the bilayer and makes the vesicles less deformable in the magnetic field. The 21-mer peptide seems to interact differently with the different lipid systems. As revealed by ^2H NMR spectroscopy, the presence of cholesterol affects the interaction between the 21-mer peptide and DMPC bilayers, which could be due to a change in membrane topology. Our results also indicate that neither peptide significantly alters the orientation and morphology of bicelles in the magnetic field. Experiments are in progress to further confirm the membrane orientation and topology of the 14-mer and 21-mer peptides. These studies should provide useful information on the mechanisms of action of the 14-mer and 21-mer peptides. In addition, we are synthesizing a series of novel synthetic peptides that possess positive charges to probe the influence of these charges on the membrane interactions of the peptides. This will be of primary importance for the design of antimicrobial agents targeted toward negatively charged bacterial membranes.

4.7 Acknowledgements

The authors thank Pierre Audet for his technical assistance and helpful discussions. This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council

(NSERC) of Canada, the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), the Centre de Recherche sur la Structure, la Fonction et l'Ingénierie des Protéines (CREFSIP), and the Centre de Recherche en Sciences et Ingénierie des Macromolécules (CERSIM). M. O. also thanks NSERC for the award of a postgraduate scholarship.

Chapitre 5

Membrane Topology of a 14-mer Model Amphipathic Peptide: A Solid-State NMR Spectroscopy Study

Marise Ouellet, Jean-Daniel Doucet, Normand Voyer et Michèle Auger

(2007) *Biochemistry* **46**: 6597-6606.

5.1 Résumé

Nous avons étudié l'interaction entre un peptide synthétique amphiphile 14-mère et des membranes modèles par spectroscopie RMN à l'état solide. Le peptide 14-mère est composé de leucines et de phénylalanines modifiées par l'addition d'éthers en couronne, et il forme une structure amphiphile hélicoïdale en solution et lorsque lié aux membranes lipidiques. Pour obtenir davantage d'information sur la topologie membranaire du peptide 14-mère, des expériences de RMN ^{31}P , ^2H et ^{15}N à l'état solide ont été réalisées sur le peptide 14-mère en interaction avec des membranes de DLPC, DMPC et DPPC orientées mécaniquement entre des plaques de verre. Les résultats obtenus en RMN ^{31}P , ^2H et ^{15}N indiquent que le peptide 14-mère est positionné à la surface des bicouches de dilaureoylphosphatidylcholine (DLPC), de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) orientées entre des plaques de verre, et qu'il perturbe l'orientation des lipides par rapport au champ magnétique. La topologie membranaire du peptide 14-mère est similaire dans les bicouches de DLPC et DMPC, alors qu'il semble inséré un peu plus profondément dans les bicouches de DPPC où un plus grand désordre orientationnel des têtes polaires et un plus grand degré de mouvement des chaînes acyle de DPPC sont observés. Les expériences d'écho rotationnel double résonance $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ ont été réalisées pour mesurer l'interaction intermoléculaire dipôle-dipôle entre le peptide 14-mère et les têtes polaires des lipides de vésicules multilamellaires de DMPC. Les résultats indiquent que le peptide 14-mère est en contact avec la région polaire des lipides DMPC. À la lumière de ces études, le mécanisme de perturbation membranaire pour

le peptide 14-mère s'explique par l'induction d'une contrainte de courbure positive à la bicouche induite par le peptide adsorbé à la surface de la bicouche et ce mécanisme semble indépendant de l'épaisseur hydrophobe des bicouches lipidiques.

5.2 Abstract

We have investigated the interaction between a synthetic amphipathic 14-mer peptide and model membranes by solid-state NMR. The 14-mer peptide is composed of leucines and phenylalanines modified by the addition of crown ethers and forms a helical amphipathic structure in solution and bound to lipid membranes. To shed light on its membrane topology, ^{31}P , ^2H , ^{15}N solid-state NMR experiments have been performed on the 14-mer peptide in interaction with mechanically oriented bilayers of dilaureoylphosphatidylcholine (DLPC), dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). The ^{31}P , ^2H and ^{15}N NMR results indicate that the 14-mer peptide remains at the surface of the DLPC, DMPC, and DPPC bilayers stacked between glass plates and perturbs the lipid orientation relative to the magnetic field direction. Its membrane topology is similar in DLPC and DMPC bilayers, whereas the peptide seems to be more deeply inserted in DPPC bilayers, as revealed by the greater orientational and motional disorder of the DPPC lipid headgroup and acyl chains. $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ rotational echo double resonance experiments have also been used to measure the intermolecular dipole-dipole interaction between the 14-mer peptide and the phospholipid headgroup of DMPC multilamellar vesicles, and the results indicate that the 14-mer peptide is in contact with the polar region of the DMPC lipids. On the basis these studies, the mechanism of membrane perturbation of the 14-mer peptide is associated to the induction of a positive curvature strain induced by the peptide lying on the bilayer surface and seems to be independent of the bilayer hydrophobic thickness.

5.3 Introduction

In recent years, there has been a growing interest in studying membrane-active peptides since they represent a potential alternative to ineffective antibiotics (8). Most of natural occurring antimicrobial peptides are short, diversified in their amino acid composition, cationic, amphipathic, and can adopt different structures in interaction with membranes (15, 25). Their membrane activity seems to be modulated both by the structural parameters of the peptides, such as helicity, charge, hydrophobicity, and the lipidic composition and the physical state of the membranes (76). As reported by Hancock et al., Jenssen et al., and Marr et al., several variants of cationic antimicrobial peptides are currently being investigated and present varied successes in clinical tests (18, 322, 323). Even if the development of antimicrobial peptides for clinical applications remains challenging, these agents possess advantages that overcome limitations of conventional antibiotics.

The antibacterial activity of natural membrane-active peptides has been extensively studied, and the readers are referred to the paper of Strandberg et al. (202) for a detailed list of synthetic and natural antimicrobial peptides studied by solid-state NMR. Beside their antibacterial activity, some membrane-active peptides like melittin, indolicidin, and cecropin-like human LL-37 show important cytotoxic properties. As reported by Hancock et al., it is very difficult to predict the hemolytic activity of some antibacterial peptides (16), and it is essential for the design of novel synthetic antibacterial agents to better understand the types of interactions involved both in the antibacterial and in the hemolytic activities of such agents. However, the ways by which membrane-active peptides perturb lipid bilayers are not well understood, and many researches have relied on synthetic model peptides to shed light on the mode of membrane perturbation and on the structural features that drive these mechanisms (324-326). General modes of action are reported in the literature, namely, the barrel-stave, the carpet-like, the toroidal, and the detergent-like models (29, 57, 66). A detailed examination of these mechanisms seems to reveal a correlation between the peptide membrane topology and the membrane disturbing effect.

Many research groups have concentrated their efforts on the design of synthetic model peptides with varying structural parameters such as membrane-anchor extremities, pH-sensitive side chains, or different hydrophobic lengths. In order to better understand the type of interactions involved in the hemolytic activity of membrane-active peptides, we have designed a synthetic helical amphipathic peptide that is an oligomer of a repeating unit of five leucine residues and two synthetic 21-crown-7-phenylalanines appropriately positioned so that the hydrophilic crown ethers align on one side of the hydrophobic helical axis to form a neutral amphipathic 14-mer peptide (Figure 5.1). Neutral peptides are rarely studied because antimicrobial activity is known to increase with cationic charge (78). However, from a mechanistic perspective, an uncharged peptide with membrane disruption activity allows studies mainly of the effect of hydrophobic forces, which seem to dominate the hemolytic activity of membrane-active peptides, on the interaction with lipids without the influence of strong electrostatic forces. The 14-mer peptide constitutes a very good model to study the interaction between lipids and membrane-active peptides since it is short and can be easily chemically modified.

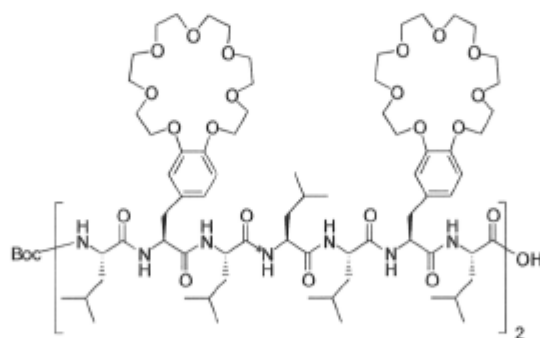


Figure 5.1: Monoprotected 14-mer peptide used in the present study. The ^{15}N -labeled leucine residue marked by an asterisk is located in the first heptamer at position 4.

Solid-state NMR spectroscopy allows the study of static samples that are aligned with respect to the magnetic field, and it then takes advantage of the orientational dependence of anisotropic interactions such as the chemical shift. Alternatively, the use of magic-angle sample spinning (MAS) allows to measure internuclear distances with relatively high accuracy (130, 133, 327). Many examples of solid-state NMR membrane topology studies of natural antimicrobial peptides are reported in the literature and allow a better understanding on their membrane activity. For example, results obtained for the antibiotic ionophore alamethicin support the “barrel-stave” model in a transmembrane fashion in both nonconductive and conductive states (328). Many members of the magainin family, such as the antimicrobial peptide PGLa and the analog MSI-78, show an in-plane orientation that seems to be correlated to their antibacterial activity (296, 297, 329).

In the present study, we have determined by solid-state NMR spectroscopy the membrane topology of the membrane-active 14-mer peptide in lipid bilayers to obtain more information on its mode of membrane perturbation. Static experiments have been performed on mechanically oriented bilayers composed of DLPC, DMPC, and DPPC. Static ^{31}P NMR spectroscopy has first been used to obtain information on the quality of the bilayer alignment, on the lipid phase, and on the conformation of the polar headgroups upon peptide binding. Static ^2H NMR spectroscopy has been used to investigate the acyl chain order in DMPC and DPPC oriented bilayers upon the 14-mer peptide addition. Subsequently, ^{15}N NMR spectroscopy has been performed on mechanically aligned bilayers to obtain information on the 14-mer peptide membrane topology. Finally, a rotational echo double resonance (*REDOR*) experiment has been performed to obtain information on the proximity of the 14-mer peptide with the DMPC headgroups. The results strongly suggest that the 14-mer peptide lies at the bilayer surface, regardless of the bilayer thickness, and destabilizes the lipid bilayer via the induction of a positive curvature strain.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Materials

DLPC, DMPC, and DPPC were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and used without purification. Oxime resin was prepared by a standard procedure using polystyrene beads (100-200 mesh, 1% DVB; Advanced ChemTech, Louisville, KY) (307). Resins with substitution levels around 0.5 mmol/g of oxime group were used. Boc-protected amino acids were purchased from Advanced ChemTech (Louisville, KY). The [¹⁵N]leucine residue was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). All solvents were reagent grade, spectrograde, or HPLC grade quality purchased commercially and used without any further purification except for DMF (degassed with N₂), dichloromethane (distilled), and diethyl ether (distilled from sodium and benzophenone). Water used throughout the studies was distilled and deionized using a Barnstead NANOpurII system (Boston, MA) with four purification columns. All other reagents were purchased from Sigma Aldrich Co. (Milwaukee, WI). Glass cover slides of 0.13-0.17 mm thickness were purchased from VWR Scientific (West Chester, PA) and cut into 10 mm × 20 mm rectangles.

5.4.2 Peptide synthesis

The unlabelled and ¹⁵N-labeled monoprotected 14-mer peptides were synthesized and purified according to published procedures (90). The N-terminal region of the 14-mer peptide is Boc-protected while the C-terminal region is deprotected. The [¹⁵N]leucine residue has been incorporated into the first heptamer segment at position 4 in the amino acid sequence.

5.4.3 Sample preparation

5.4.3.1 Oriented bilayers stacked between glass plates

The DLPC, DMPC, and DPPC bilayers were prepared by dissolving 30 mg of phospholipids in 120 μL of chloroform, and the solution was deposited onto 18 thin cover glasses. The glass plates were allowed to dry in air for 24 h, and then stacked and hydrated with deionized water in a closed chamber for at least 24 h at 70°C. Subsequently, the plates were wrapped in Parafilm before use. This procedure yielded satisfactory alignment of the membrane, as indicated by the narrow ^{31}P resonances of the lipids (Figure 5.2). For the preparation of the peptide-containing bilayers, the dry peptide was codissolved with dry lipids in chloroform in a lipid/peptide molar ratio of 60:1. The following steps are the same as described above for the preparation of pure aligned bilayers stacked between glass plates. Since the lipids found in natural membranes are in the fluid phase, the NMR spectra of mechanically oriented bilayers have been obtained at temperatures above the lipid phase transition, i.e. at 37°C for the DLPC and DMPC bilayers and 50°C for DPPC bilayers.

5.4.3.2 Lyophilized sample

Dry DMPC (40 mg) and the 14-mer peptide in a lipid/peptide molar ratio of 60:1 were codissolved in 180 μL of chloroform to ensure thorough mixing. The solvent was removed under nitrogen gas, followed by storage under vacuum overnight to remove all traces of organic solvent. The dry sample was hydrated with 180 μL deionized water with 20% (w/w) lipids in water. The resulting suspension underwent at least three freeze (liquid N_2)/thaw (lipid phase transition temperature of 23°C + 7°C)/vortex shaking cycles to ensure the formation of multilamellar vesicles. The sample was rapidly frozen, lyophilized overnight, and then packed into a 4 mm NMR tube prior to data acquisition.

5.4.4 NMR experiments

5.4.4.1 Static ^{31}P , ^2H and ^{15}N NMR experiments

The static proton-decoupled ^{31}P and ^{15}N NMR spectra, and ^2H NMR spectra, were acquired with a Bruker Avance 300 MHz spectrometer (Bruker Canada, Milton, Ontario, Canada). The ^{31}P NMR spectra were obtained at 121.5 MHz with TPPM proton decoupling (309). Using 2048 data points, typically 1200 scans were acquired with a pulse length of 6 μs and a recycle delay of 4 s. The spectral width was 50 kHz, and a line broadening of 50 Hz was applied to all static ^{31}P spectra. The thin glass plates were inserted into a flat coil of a home-built solid-state NMR probe head with the glass plate normal oriented parallel to the magnetic field direction. The chemical shifts were referenced relative to external H_3PO_4 , 85% (0 ppm).

The ^2H NMR experiments were carried out at 46.1 MHz using a quadrupolar echo sequence (195). The 90° pulse length was 5 μs , and the interpulse delay was 60 μs . A total of 6400 scans were acquired using 4 K data points, and the recycle time was set to 500 ms. The thin glass plates were inserted into a flat coil of a home-built solid-state NMR probe head. A line broadening of 100 Hz was applied to all static ^2H NMR spectra.

The ^{15}N NMR spectra were obtained at 30.4 MHz using a cross-polarization (CP) pulse sequence with TPPM proton decoupling (309). Using 2048 data points, typically 100000 scans were acquired with a ^1H - ^{15}N CP contact time of 3 ms and a recycle delay of 4 s. The spectral width was 30 kHz, and a line broadening of 300 Hz was applied to all ^{15}N oriented spectra. The chemical shifts were referenced relative to external $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (41.5 ppm) corresponding approximately to 0 ppm for liquid NH_3 .

5.4.4.2 REDOR experiments

NMR spectra were acquired with a Bruker Avance 400 MHz spectrometer (Bruker Canada, Milton, Ontario, Canada). REDOR requires that two spectra be collected, one with pulses on the I channel to produce the spectrum S and one without to produce the S_0 spectrum. The ratio of the difference between the two spectra ($\Delta S = S_0 - S$) and S_0 can be related to the dipolar coupling D_{IS} , and then the internuclear distance can be easily calculated using the equation:

$$r_{IS} = \sqrt[3]{\frac{\epsilon_0 \gamma_I \gamma_S h}{16\pi^2 D_{IS}}} \quad (5.1)$$

where ϵ_0 is the vacuum permeativity, γ_I and γ_S are the gyromagnetic ratios of the I and S spins, respectively, h is the Planck constant, and the dipolar coupling, D_{IS} , is in hertz (222). The spinning speed was 3800 Hz. The ^1H - ^{15}N CP contact time was 1 ms with a matched spin-locked CP of 30.4 kHz. Spectra were obtained with a recycle delay of 3 s and ^1H decoupling field strength of 83.0 kHz. Spectra were processed with a 200 Hz line broadening. The phase cycling XY8 was used to compensate for errors in the flip angle, resonance offset effects, and variation in the B_1 field (219). The B_1 field values were 41.7 kHz for ^{31}P 180° pulses and 35.7 kHz for ^{15}N 180° pulses. The acquisition temperature was -10°C to reduce motional averaging. The sample was placed into a 4 mm NMR tube inserted into a magic-angle spinning (MAS) probe. The chemical shifts were referenced relative to external $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (41.5 ppm) corresponding approximately to 0 ppm for liquid NH_3 . Bessel function expressions in Microsoft Excel were used to simulate the $\Delta S/S_0$ versus dephasing time ($N_c T_r D$) curves, where N_c is the number of rotor cycles before data acquisition, T_r is the rotor period, and D is the dipolar coupling constant (222).

5.5 Results and discussion

5.5.1 Peptide design

The general idea behind the design of the 14-mer peptide investigated in the present study was to use a α -helical peptidic framework made of leucines and phenylalanines modified with crown ethers. These two amino acids are known for their high propensity to induce a helical conformation to the chain, and the crown ethers are ingeniously positioned to lead to their alignment under such helical form. The polar crown ethers on one side and the hydrophobic leucine side chains on the opposite side result in an amphipathic peptide that can mimic native properties of natural membrane-active peptides. Both the peptide helical and amphipathic characters were important structural features to assess because they allow an optimal interaction with amphipathic biological membranes. Synthetic crown ethers have been used as the constituent for the polar face of the helix due to their neutral polar character and the ease by which their size can be modified, therefore allowing control on structural parameters such as the peptide amphipathic character and polar angle. More specifically, 21-crown-7 macrocyclic ethers were selected because of their low binding affinity to alkali metal ions and their more significant polar character as compared to smaller crown ethers. The conformation of the 14-mer peptide has been investigated by circular dichroism spectropolarimetry, and the results revealed that it adopts a helical conformation (97).

Because we are interested in defining the role played by hydrophobic interactions in the membrane perturbation by membrane-active peptides, and that the hemolytic activity is closely related to the peptide hydrophobic character, we have studied the 14-mer peptide in its uncharged form (76). The membrane perturbing activity of the 14-mer peptide has previously been studied by fluorescence and ^{23}Na NMR spectroscopies and revealed that the 14-mer peptide promotes the rapid release of calcein and Na^+ from vesicles and

hemoglobin from erythrocytes (97). Preliminary studies have been performed to evaluate the antibacterial activity of the 14-mer peptide in *Escherichia coli* Gram-negative bacteria by the use of the broth dilution method from which the minimal inhibitory concentration is calculated (unpublished results). The 14-mer peptide was tested at concentrations of 10, 1, 0.1, and 0.01 μM , and no growth inhibition was observed. As expected from its composition and conformation, the 14-mer peptide exhibits a cytolytic activity on human red blood cells with a minimal concentration of 4 μM . These studies indicate a high membrane activity for the 14-mer peptide and, more specifically, a hemolytic activity. The 14-mer peptide therefore constitutes a good model to study the way by which antibacterial peptides with hemolytic activity perturb the bilayer integrity. We have also performed ^{31}P and ^2H solid-state NMR experiments on unoriented zwitterionic and anionic vesicles, and the results showed that the 14-mer peptide affects the conformation of the lipid polar headgroup, and weakly orders the lipid acyl chains (330), suggesting an in-plane orientation of the 14-mer peptide.

5.5.2 Solid-state NMR spectroscopy

5.5.2.1 Phosphorus-31 NMR

Since the phospholipid headgroup contains a phosphorus-31 atom with a 100% natural isotopic abundance, ^{31}P NMR is a powerful technique to monitor changes occurring in the polar region of the bilayer (197, 198, 291). We have used ^{31}P NMR spectroscopy to investigate changes occurring in the headgroup region of mechanically aligned bilayers of DLPC, DMPC, and DPPC upon the addition of the 14-mer peptide. The choice of lipids with different acyl chain lengths was aimed to determine whether the bilayer thickness can affect the membrane topology of the 14-mer peptide. More specifically, static ^{31}P solid-state NMR spectra provide information on the conformation of the polar headgroup and on the quality of the alignment of phospholipid bilayers by analyzing changes in the chemical

shift (δ , ppm) and in the full width at half-maximum (fwhm, ppm) of the resonance and in the chemical shift anisotropy (CSA, ppm) throughout the entire spectrum.

We have first investigated the effect of the 14-mer peptide on zwitterionic bilayers of different acyl chain lengths, namely, DLPC (19.8 Å), DMPC (24.4 Å), and DPPC (26.6 Å) bilayers (331). These average chain length values are reported by Petrache et al. (331) for lipids in the liquid-crystalline state at temperatures of 30°C for DLPC and DMPC, and 50°C for DPPC. The ^{31}P NMR static spectra and related spectral parameters of pure and peptide-containing lipid systems are displayed in Figure 5.2 and Table 5.1. The spectra of the pure lipid systems are characteristic of well-aligned bilayers in the fluid phase with the bilayer normal parallel to the external magnetic field B_0 , with a minimal contribution of 90° aligned lipids with acyl chains perpendicular to the B_0 direction.

Table 5.1: ^{31}P NMR spectral parameters for DLPC, DMPC, and DPPC bilayers in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

	δ (ppm)		S_2	FWHM (ppm)		% Alignment	
	Pure	14-mer		Pure	14-mer	Pure	14-mer
DLPC	31.2	29.7	0.95	1.9	2.3	72	57
DMPC	31.1	30.1	0.97	1.7	1.9	81	64
DPPC	32.0	30.1	0.94	1.5	3.6	99	63

As reported in Table 5.1, a single and sharp resonance is observed for DLPC (DMPC, DPPC) at 31.2 ppm (31.1 ppm, 32.0 ppm), with a full width at half-maximum (fwhm) of 1.9 ppm (1.7 ppm, 1.5 ppm). We evaluate the proportion of aligned versus nonaligned lipids by the ratio of the spectral area of the single resonance (corresponding to lipids oriented parallel to the magnetic field direction) over the entire spectral area, expressed in percentage (332). For DLPC, DMPC, and DPPC systems, we obtain a percentage of alignment of 72%, 81%, and 99%, respectively.

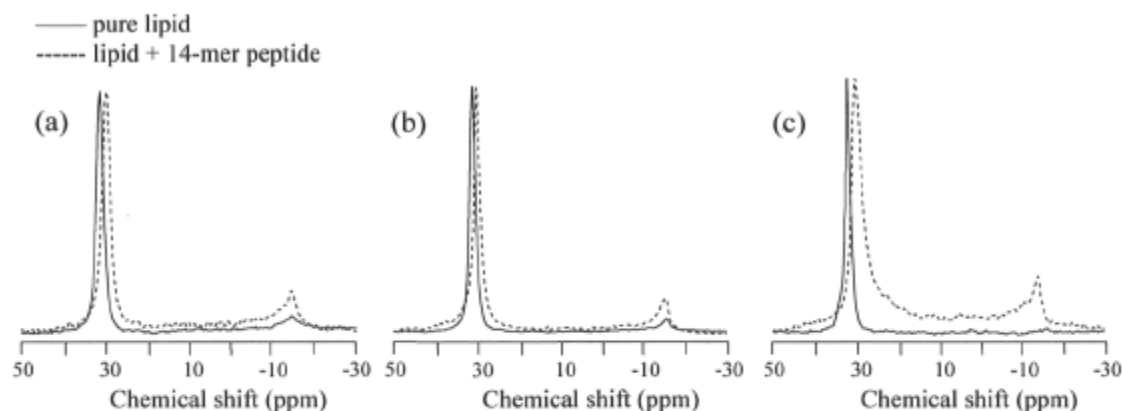


Figure 5.2: ^{31}P NMR spectra of mechanically oriented lipid bilayers of (a) DLPC and (b) DMPC at 37°C , and (c) DPPC at 50°C , in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

The ^{31}P NMR spectra of the DLPC bilayers with and without the 14-mer peptide are presented in Figure 5.2(a). The ^{31}P NMR spectrum of the pure system shows one single intense resonance with δ and fwhm of 31.2 ppm and 1.9 ppm. Upon the 14-mer peptide binding, there is a decrease in the CSA reflected by the resonance being shifted by 1.5 ppm and broadened by 0.4 ppm. There is also the appearance of a small resonance at -14.6 ppm and an increase of the spectral intensity throughout the powder pattern, i.e., between 29.7 ppm and -14.6 ppm. The lipid/peptide system shows a degree of 0° alignment of 57 % compared to 72 % for pure DLPC bilayers. In the pure DMPC bilayers (Figure 5.2(b)), a single resonance appears at 31.1 ppm with a line width of 1.7 ppm. As shown on the NMR spectrum, the decrease in the CSA upon the 14-mer peptide binding is reflected by a resonance shift of 1.0 ppm and a broadening of the resonance by 0.2 ppm. A new component characteristic of 90° aligned lipids also appears at -15.3 ppm. As in the DLPC/14-mer system, the spectral intensity between 30.1 ppm and -15.3 ppm is slightly increased upon peptide addition, and the system shows a degree of 0° alignment of 64 % compared to 81 % for pure DMPC bilayers. In pure DPPC bilayers (Figure 5.2(c)), a single resonance is observed at 32.0 ppm with a line width of 1.5 ppm. Upon the 14-mer peptide addition to the DPPC bilayers, the decrease in the CSA is reflected by a resonance shift of 1.9 ppm and a broadening of 2.1 ppm, and the system shows a change in the degree of

alignment, which is evaluated at 99 % for the pure system and at 63 % for the peptide-containing bilayers. As observed for the DLPC and DMPC bilayers, a new component characteristic of 90° aligned lipids appears at -13.8 ppm with an increase of the spectral intensity throughout the powder pattern. By analyzing the three lipid systems, it seems that the 14-mer peptide perturbs the conformation of the lipid polar headgroup in a similar manner, but subtle changes are observed on the NMR spectra of the three lipid systems. The DPPC lipids have longer acyl chains than DLPC and DMPC lipids and then stronger van der Waals forces between adjacent DPPC lipids (331). These forces result in an overall stabilization of the bilayer that is reflected on the ²H NMR spectrum of DPPC by the larger quadrupolar splitting (Figure 5.3(b)) and keep the headgroups closer together. On the other hand, the ³¹P NMR spectra have been recorded at 37°C for DLPC and DMPC bilayers, corresponding to a difference of 38°C and 14°C compared to their temperature phase transitions, respectively. For the DPPC system, however, the ³¹P NMR spectra have been recorded at 50°C which is only 7°C above the phase transition. The greater effect on the conformation and/or orientation of the DPPC lipid headgroups upon the 14-mer peptide binding can be explained by the fact that the pure DPPC bilayers are more ordered than the DLPC and DMPC bilayers and then less susceptible to accommodate a membrane surface defect. The effect of the 14-mer peptide seems then to be more amplified in DPPC bilayers than in DLPC and DMPC bilayers. Picard et al. have proposed another way to quantify the effect of peptides on the chemical shift by evaluating a relative order parameter of the form:

$$S_2 = \frac{\delta}{\delta_{ref}} \quad (5.2)$$

in which δ_{ref} is the chemical shift of a reference system, such as the pure lipid system in the absence of the 14-mer peptide (200). As seen in Table 5.1, we obtain S_2 values of 0.95, 0.97, and 0.94 for DLPC, DMPC, and DPPC bilayers, respectively. These S_2 values quantify the slight perturbing effect of the 14-mer peptide on the lipid headgroup dynamics and/or orientation of the DLPC, DMPC, and DPPC bilayers.

The overall decrease in the CSA observed in DLPC, DMPC, and DPPC bilayers upon the addition of the 14-mer peptide could be explained by an interaction of the peptide at the polar headgroup of the lipids. The strategic positioning of the crown ethers at sites 2, 6, 9, and 13 makes all the crown ethers well sequestered on one side of the α -helix and confers an amphipathic nature to the 14-mer peptide. When inserted into the bilayer, the crown ethers are likely facing the aqueous phase, whereas the hydrophobic helix composed of mainly leucine residues is likely facing the hydrophobic region of the bilayer. The possible interfacial location of the 14-mer peptide could then affect the conformation of the polar headgroups of DLPC, DMPC, and DPPC bilayers. Buffy et al. also observed orientational disorder of lipids in interaction with the antimicrobial peptide RTD-1, whatever the varying lipid acyl chain length, suggesting that RTD-1 binds to the bilayer surface (332). Another important feature observed on the ^{31}P NMR spectra is the appearance of a broad powder pattern in DLPC, DMPC, and DPPC spectra, as depicted in Figure 5.2. This is reflected in the calculation of the percentage of alignment disorder as shown in Table 5.1. For DLPC, DMPC, and DPPC bilayers, there is a loss of parallel orientation of 15%, 17%, and 36%, respectively. It is important to mention that two distinct ^{31}P NMR experiments have been performed for each system investigated to make sure that the unoriented component observed on the ^{31}P NMR spectra originates from the membrane interaction of the 14-mer peptide and not from variability in the sample preparation. The duplicate spectra are highly reproducible and show the same trend, namely, an increase in the percentage of misalignment with an increase in the lipid acyl chain length.

Mecke et al. have reported an upfield shift of the DMPC resonance, and a broad line of low intensity, upon MSI-78 binding, an analog of the magainin family (329). They attributed the shift to either a tilt of the lipid and/or a change of the lipid headgroup conformation and the powder pattern of low intensity to different orientations of the lipids. Harzer et al. have studied model peptides composed of leucine and alanine residues in interaction with POPC membranes (325). They have also attributed changes in the ^{31}P chemical shift and the signal intensity of nonoriented lipids to conformational and/or orientational changes at the lipid headgroup or to the phospholipids as a whole. The

broadening of the 0° oriented resonance has also been observed upon the protegrin-1 binding to POPC/POPG bilayers (333). Mani et al. explained the asymmetric broadening of the 0° resonance by an increase in the mosaic spread of the bilayers. From ^{31}P NMR spectra, it seems that the 14-mer peptide disrupts both the dynamics and/or orientation of the polar headgroup as well as the quality of orientation of the lipids as revealed by the S_2 order parameter and the percentage of alignment values. These effects are however more pronounced for DPPC bilayers than for DLPC and DMPC bilayers.

5.5.2.2 Deuterium NMR

We have investigated the effect of the 14-mer peptide on the lipid order of bilayers stacked between glass plates by measuring the quadrupolar splitting upon peptide addition. The increase (decrease) in the quadrupolar splitting ($\Delta\nu_Q$) for a C-D bond is associated to order (disorder) in the deuterated chains and is related to an order parameter S_{CD} :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} (3 \cos^2 \theta - 1) S_{CD} \quad (5.3)$$

where $(e^2 q Q/h)$ is the quadrupole coupling constant for C-D bonds (~ 167 kHz) and θ is the angle between the bilayer normal and B_0 (291).

The ^2H static NMR spectra and related spectral parameters of peptide-containing bilayers stacked between glass plates are shown in Figure 5.3 and Table 5.2. A lipid/peptide molar ratio of 60:1 was used and the spectra were recorded at 37°C and 50°C for DMPC and DPPC bilayers.

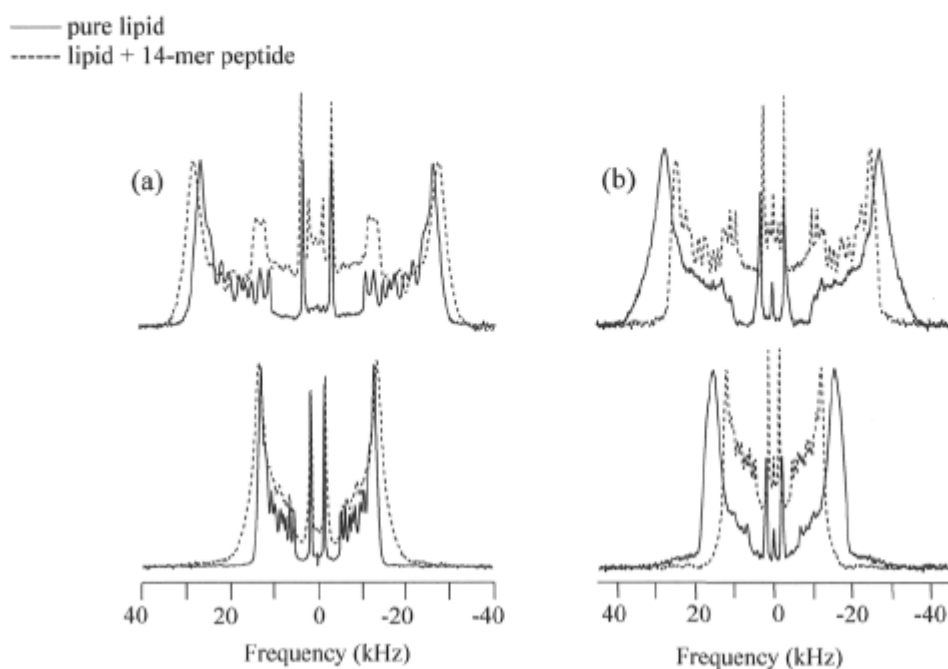


Figure 5.3: ^2H NMR spectra of mechanically oriented lipid bilayers of (a) DMPC at 37°C , and of (b) DPPC at 50°C , with the bilayer normal parallel (*top row*) and perpendicular (*bottom row*) to the magnetic field direction in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

The spectra have been recorded at two bilayer alignments, with the bilayer normal parallel and perpendicular to the magnetic field direction. The pure DMPC (Figure 5.3(a) (*top row*)) and DPPC bilayers (Figure 5.3(b) (*top row*)) in a parallel orientation show a quadrupolar splitting $\Delta\nu_P$ of 52.5 and 55.0 kHz for the plateau region and a $\Delta\nu_M$ of 6.3 and 6.0 kHz for the terminal methyl group of the lipid acyl chains. Upon the 14-mer peptide addition to the DMPC and DPPC bilayers, two different spectral patterns are observed on the DMPC and DPPC ^2H NMR spectra. The first spectral feature is an increase of the $\Delta\nu_P$ of DMPC by 3.0 kHz, whereas the $\Delta\nu_P$ of DPPC is decreased by 5.4 kHz. This ordering at the plateau region of the DMPC acyl chains is reflected by an S_{CD} order parameter of 0.44 compared to the pure bilayers with an S_{CD} order parameter of 0.41. The methyl group of DMPC bilayers is not significantly affected by the 14-mer peptide. This is reflected by an

unchanged S_{CD} order parameter of 0.05. The DPPC acyl chains are globally disordered upon the addition of the 14-mer peptide, with S_{CD} order parameters of 0.39 (0.04) for the plateau (methyl) region, compared to the pure DPPC bilayers with S_{CD} order parameters of 0.43 (0.05). The second spectral feature observed upon the peptide addition in both bilayers is the presence of a powder pattern at ± 10 kHz. ^2H NMR spectra have then been acquired at the 90° orientation to determine whether this powder pattern originates from a large decrease of the maximal quadrupolar splitting for a fraction of oriented lipids or from nonoriented lipids in DMPC and DPPC bilayers. If the powder pattern at ± 10 kHz originates from a large decrease of the maximal quadrupolar splitting, a powder pattern at ± 5 kHz should be observed on ^2H NMR spectra acquired at the 90° orientation. Mani et al. and Yamaguchi et al., who have studied the antimicrobial peptide protegrin-1, observed a similar behavior in POPC and POPC/POPG bilayers in both bilayer orientations at various lipid/peptide molar ratios (334, 335). They attributed the signals to nonoriented lipids that deviate from the initial parallel orientation before the peptide addition. As observed in the ^{31}P NMR spectra of DMPC and DPPC bilayers (Figures 5.2(a) et (b)), the 14-mer peptide seems to perturb the lipid orientation in a similar manner.

Table 5.2: Quadrupolar splittings and S_{CD} order parameters of DMPC- d_{54} and DPPC- d_{62} for the plateau and methyl regions in 0° oriented bilayers in the absence and presence of the 14-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

	$\Delta\nu_P$ (kHz)		$S_{CD(P)}$		$\Delta\nu_M$ (kHz)		$S_{CD(M)}$	
	Pure	14-mer	Pure	14-mer	Pure	14-mer	Pure	14-mer
DMPC	52.5	55.5	0.41	0.44	6.3	6.8	0.05	0.05
DPPC	55.0	49.6	0.43	0.39	6.0	5.5	0.05	0.04

In the perpendicular orientation, i.e., with the bilayer normal perpendicular to the magnetic field direction, ^2H NMR spectra are mainly sensitive to motional disorder. In the DMPC system (Figure 5.3(a) (*bottom row*)), when the bilayers are in the perpendicular orientation, a slight increase is observed in the quadrupolar splitting of the plateau region of lipid acyl chains in the presence of the 14-mer peptide. Similar results have also been obtained by Mani et al. with PG-1 peptide in POPC/POPG bilayers (334). For the DPPC

system in the perpendicular orientation, however (Figure 5.3(b) (*bottom row*)), there is a decrease in the quadrupolar splitting of both the plateau and the methyl region of the lipid acyl chains. Because no powder pattern is observed at ± 5 kHz on the DMPC and DPPC ^2H NMR spectra in the perpendicular orientation, we can conclude that the presence of a powder pattern in the parallel orientation results from orientational disorder in DMPC bilayers, whereas both orientational and motional disorders are present in DPPC bilayers upon peptide addition. The ordering effect of the plateau region of DMPC bilayers stacked between glass plates upon the 14-mer peptide addition, as revealed by the increase in $\Delta\nu$ and S_{CD} order parameter, is consistent with previous results on DMPC multilamellar vesicles, and supports the possible surface location and capping effect of the 14-mer peptide on the lipid molecules (330).

5.5.2.3 Nitrogen-15 NMR

We have used proton-decoupled solid-state ^{15}N NMR spectroscopy to investigate the membrane orientation of the 14-mer peptide in DLPC, DMPC, and DPPC bilayers stacked between glass plates. This can be done using a ^{15}N -labeled peptide incorporated into oriented bilayers due to the orientational dependence of the ^{15}N chemical shift. The 14-mer peptide has been synthesized with ^{15}N incorporated into the leucine residue at position 4 in the amino acid sequence (Figure 5.1). Due to the helical conformation of the 14-mer peptide, and to the size and orientation of the σ_{33} element of the ^{15}N chemical shift tensor, it is possible to correlate the ^{15}N chemical shift with the helix orientation relative to the magnetic field direction from oriented ^{15}N NMR spectra (131, 211). Chemical shifts below 100 ppm or higher than 200 ppm are expected for helical peptides oriented in an in-plane or transmembrane fashion, respectively.

The ^{15}N NMR spectra of the 14-mer peptide incorporated in mechanically aligned bilayers are displayed in Figure 5.4. The common feature to the three peptide-containing bilayers is the presence of one resonance at a chemical shift below 100 ppm. The peaks are observed at 75.0, 70.0, and 84.0 ppm for DLPC (Figure 5.4(a)), DMPC (Figure 5.4(b)), and

DPPC bilayers (Figure 5.4(c)). These chemical shifts correspond to a surface orientation for the 14-mer peptide, regardless of the bilayer hydrophobic thickness. Intensity in the 25-60 ppm range is in part due to the natural abundance of ^{15}N of the lipid choline headgroup.

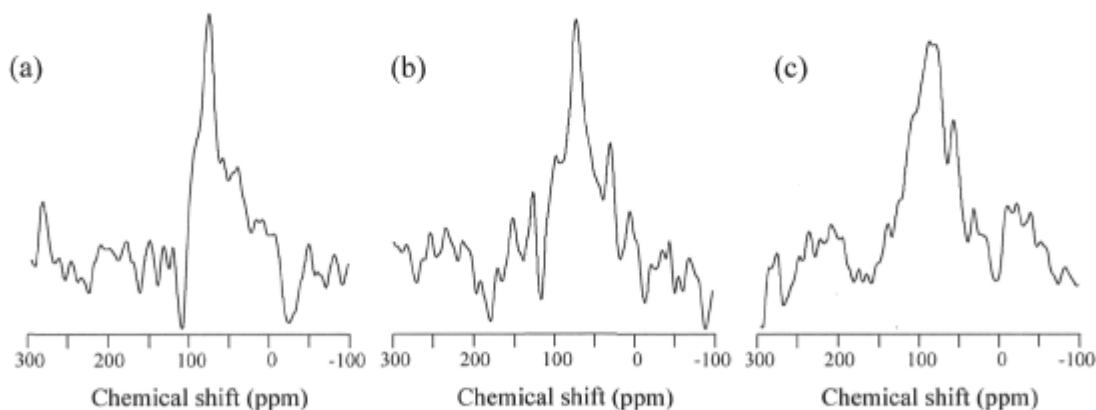


Figure 5.4: ^{15}N NMR spectra of the 14-mer peptide incorporated in mechanically oriented lipid bilayers of (a) DLPC and (b) DMPC at 37°C and (c) DPPC at 50°C at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

Numerous membrane-active peptides have been reported to have a surface orientation (336-338). Chemical shifts of 75 and 70 ppm obtained for the 14-mer peptide in DLPC and DMPC bilayers correspond to the upfield end of the ^{15}N chemical shift powder pattern, whereas the chemical shift of 84 ppm obtained in DPPC bilayers slightly deviates from this value. The deviation in DPPC bilayers could be explained by a slight tilt of the peptide relative to the magnetic field direction or motion of the peptide that narrows the powder pattern (339). Also, the ^{15}N resonance observed for the 14-mer peptide in DPPC bilayers appears to be broadened compared to the ^{15}N resonances obtained for the 14-mer peptide in DLPC and DMPC bilayers. This broadening of the resonance for the 14-mer peptide incorporated in DPPC bilayers could be explained by a larger heterogeneity in the membrane orientation of the peptide, compared to its orientation in DLPC and DMPC bilayers. It could also be explained by membrane surface defects since the ^{31}P NMR spectra of DPPC/14-mer bilayers showed a greater membrane disorder alignment with a loss of bilayer alignment of 33 %. Mattila et al. have studied the first internal S4 segment of voltage-gated sodium channels in POPC and POPC/POPS bilayers (340). They have

observed that, despite the fact that the peptide is oriented on the bilayer surface in both systems, the ^{15}N NMR resonance is broadened in POPC/POPS bilayers compared to that in POPC bilayers. They have proposed that the broadening can be due to conformational and topological fluctuations of the peptide, as well as membrane defects such as bilayer undulations and misalignments. Sudheendra et al. have also reported similar behavior of the model ion channel peptide in DOTAP lipid bilayers at high peptide concentration, where they correlated the increase dispersion of ^{15}N NMR signal to membrane distortions or misalignments and/or to peptide conformational changes (341). From the ^{15}N NMR spectra obtained in the present study, it seems that the 14-mer peptide adopts a homogeneous topology in DLPC and DMPC bilayers, whereas it adopts a broader range of surface orientations with slight tilts and/or conformational changes in DPPC bilayers. The possible heterogeneity in the membrane topology of the 14-mer peptide in DPPC bilayers seems to be correlated to its disordering effect in the DPPC acyl chains as revealed by ^2H NMR spectroscopy (Figure 5.3(b)).

5.5.2.4 Distance measurement

We have also investigated the location of the 14-mer peptide in DMPC lipid bilayers by the REDOR technique. More specifically, $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR allows the measurement of intermolecular dipole-dipole interactions between the [^{15}N]leucine residue in the 14-mer peptide and the ^{31}P nucleus in the phospholipid headgroup. The determination of the relative position of the 14-mer peptide with respect to the polar headgroups has been performed on lyophilized DMPC multilamellar vesicles at $\sim -10^\circ\text{C}$ to minimize all large-amplitude motions. Figure 5.5 shows the $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR dephasing $\Delta S/S_0$ curve for the [^{15}N]Leu₄-14-mer peptide as a function of the dipolar evolution time for a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

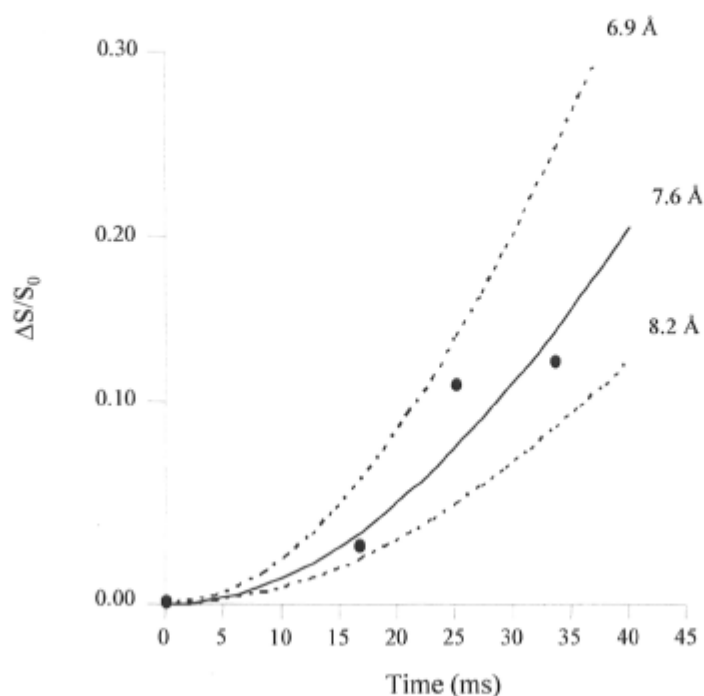


Figure 5.5: 40.5-MHz $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR dephasing ($\Delta S/S_0$) for the 14-mer peptide in lyophilized DMPC multilamellar vesicles at a lipid/peptide molar ratio of 60:1. The spinning speed was 3800 Hz. The solid line is the best fit to the experimental $\Delta S/S_0$ values and corresponds to a mean internuclear ^{15}N - ^{31}P distance of 7.6 ± 0.6 Å. The dotted lines illustrate the distribution of distances.

By fitting the experimental points corresponding to the dipolar evolution time range from 0 to 35 ms, a mean distance of 7.6 ± 0.6 Å seems to dominate the dephasing up to 35 ms of dipolar evolution time. The dephasing did not extend over 35 ms possibly because of the low signal-to-noise-ratio, the small size of the dipolar coupling, or spin-spin relaxation. Toke et al. have performed a similar study with an analogue of the magainin family, the K3 peptide, in interaction with lyophilized MLVs, and they measured a $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ distance of 5.2 Å (342). Hirsh et al. have performed $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR experiments by measuring intermolecular distances between ^{13}C -labeled magainin analogue peptides and the lipid headgroup, in a similar manner to the $^{15}\text{N}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR approach (343). The distance range they measured is similar to the one we obtained and support a model where the peptide is bound near the phospholipid headgroups.

5.5.3 Mechanism of membrane perturbation

The goal of the present study was to determine the membrane topology of the 14-mer peptide to shed light on its mechanism of membrane perturbation. Solid-state NMR spectroscopy has been shown to be very useful to probe the interactions and the membrane topology of the 14-mer peptide in DLPC, DMPC, and DPPC bilayers stacked between glass plates. Our ^{31}P , ^2H , ^{15}N , and REDOR NMR results suggest that the 14-mer peptide perturbs the lipid bilayer integrity. We can obviously rule out the barrel-stave and detergent-like mechanisms, since no resonance has been observed in the downfield region of the ^{15}N chemical shift powder pattern in all bilayers, as well as the absence of an isotropic resonance in all NMR spectra. With the peptide concentration for which the membrane activity of the 14-mer peptide has been observed in previous and present studies, the carpet-like model is very unlikely. In fact, supposing that all the peptide is bound to the bilayer, we evaluate that there are at maximum 17 peptide molecules per thousand lipid molecules. As reported by Wieprecht et al. who studied model peptides of various polar angles, membrane permeabilization that occurs in such range of peptide concentration is much lower than the required concentration to form a carpet leading to membrane disintegration (88).

Previous fluorescent spectrometric results reported that the dye leakage of vesicles is inhibited by the presence of POPE lipids added to PC and slightly increased by the addition of LPC (97). We can explain these observations by the fact that the inverse-cone shapes of LPC and the 14-mer peptide are agonistic and both contribute to the induction of a positive bilayer curvature and then increase the dye leakage (Figure 5.6). The positive curvature strain imposed on the bilayer by the peptide is, however, counterbalanced by the presence of the cone-shaped POPE lipids that have an antagonistic shape compared to the shape of the 14-mer peptide. When the bilayer undergoes a positive curvature strain, the lipid molecules that surround the peptide are constrained to tilt relative to the bilayer normal. These lipids could then contribute to the powder pattern signal observed in both ^{31}P and ^2H NMR spectra.

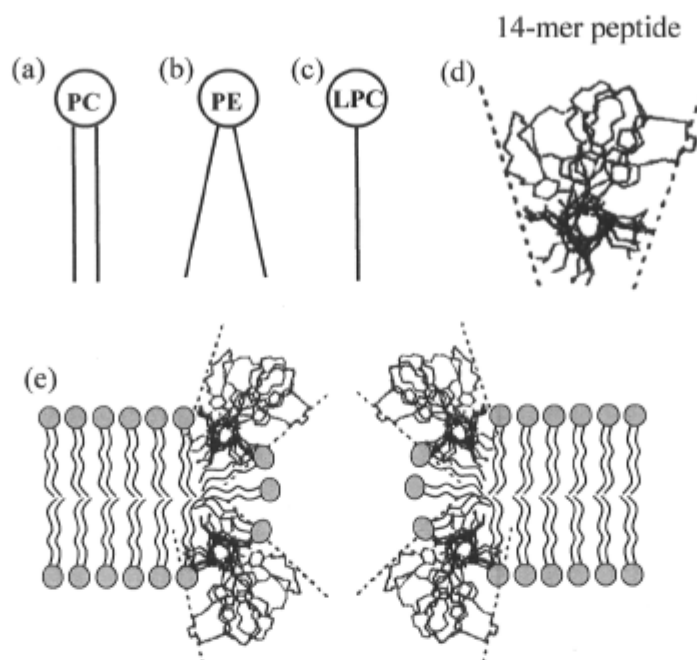


Figure 5.6: Cross-sectional views of (a) cylindrical PC, (b) cone-shaped PE, (c) inverse-cone shaped LPC, (d) inverse-cone shaped 14-mer peptide, and (e) the positive curvature strain and membrane destabilization imposed by the 14-mer peptide laid at the bilayer surface (adapted from ref. (97) and reproduced with permission of The Royal Society of Chemistry).

Because it is reported in the literature that some membrane-active peptides, such as alamethicin, magainin, and melittin, have different membrane topologies depending on their concentration, we have performed ^{31}P , ^2H , and ^{15}N NMR experiments on the 14-mer peptide/DMPC system at a lipid/peptide molar ratio of 20:1. As shown in Figure 5.7, the ^{15}N NMR spectrum (*bottom row*) indicates that the 14-mer peptide remains at the bilayer surface with a ^{15}N chemical shift of 81.0 ppm, even at a lipid/peptide molar ratio of 20:1. In addition, there is no presence of an additional isotropic phase on ^{31}P and ^2H NMR spectra (*top and middle rows*), reflecting the absence of smaller lipid structures despite the increase in peptide concentration. ^{31}P and ^2H NMR spectra only show an increase in orientational disorder compared to that observed at a lipid/peptide molar ratio of 60:1. The results

obtained in the present study are complementary to the previous fluorescence results and support a mechanism of membrane perturbation in which the 14-mer peptide binds to the membrane surface, thereby causing local destabilization of the bilayer via positive curvature strain, similar to the in-plane diffusion or toroidal models (Figure 5.6).

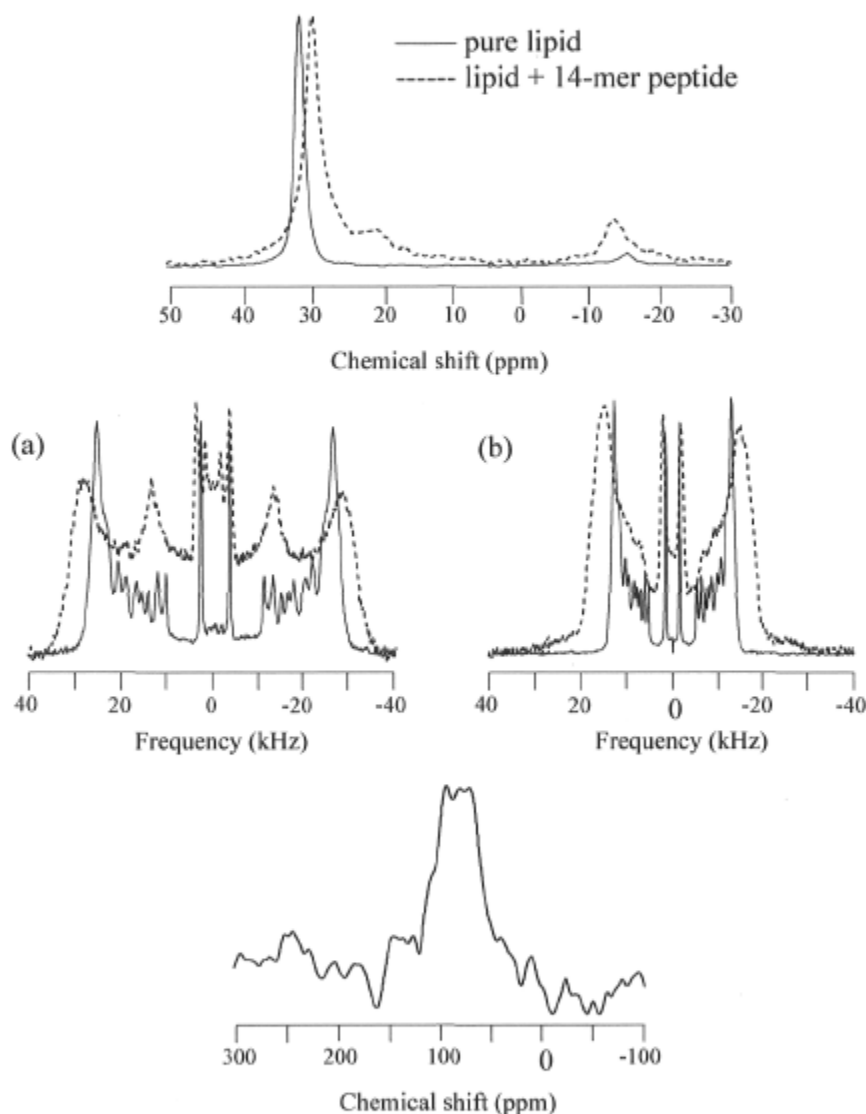


Figure 5.7: ^{31}P (top row) and ^2H (middle row) NMR spectra of DMPC mechanically oriented lipid bilayers in the absence and presence of the 14-mer peptide and ^{15}N (bottom row) NMR spectra of the 14-mer peptide incorporated in DMPC mechanically oriented lipid bilayers. The spectra were acquired at 37°C and at a lipid/peptide molar ratio of 20:1.

We do not, however, exclude the possible formation of a pore via the toroidal model, since the peptide-lipid complex involved in such a pore imparts the positive curvature strain to the bilayer. Many research groups have already reported the toroidal model for a great variety of natural and synthetic peptides derived from the magainin family and that showed a surface orientation, namely, MSI-843, MSI-78, and magainin 2 (306, 344, 345). The toroidal model could be a possible way to understand the membrane permeabilization activity of the 14-mer peptide if we consider its shape and the important size of the hydrophilic side composed of crown ethers. We evaluate the polar angle subtended by the crown ethers of the 14-mer peptide to approximately 110° . Uematsu et al. have studied model peptides with polar angles of 100° and 180° , respectively (89). They concluded that the peptides with a polar angle of 100° exhibited higher membrane permeabilization activity and pore rate formation. This higher pore rate formation, and therefore the reduced stability of such lipid-peptide complex, could explain the fact that no ^{15}N NMR signal was observed in the chemical shift region characteristic of transmembrane alignment. It is also possible that the number of peptide molecules that contributed to the pore formation is too small to be detected, as suggested for magainin 2 (71).

5.6 Conclusions

We have investigated in the present study the membrane topology of a 14-mer amphipathic peptide in oriented model membranes by solid-state NMR spectroscopy. The model membranes used are DLPC, DMPC, and DPPC oriented bilayers stacked between glass plates and lyophilized DMPC multilamellar vesicles. The results obtained from the peptide-containing bilayers stacked between glass plates suggest that the peptide adopts an in-plane orientation and perturbs the membrane via the induction of a positive curvature strain. The membrane topology of the 14-mer peptide in DLPC and DMPC bilayers seems to be homogeneous, whereas the peptide appears to be more deeply inserted in DPPC bilayers, as revealed by the disorder induced in the DPPC headgroup and acyl chains seen in ^{31}P and ^2H NMR spectra. The REDOR experiment performed on lyophilized DMPC

multilamellar vesicles also confirms the proximity of the 14-mer peptide to the lipid headgroups.

5.7 Acknowledgements

The authors thank Pierre Audet for technical assistance and helpful discussions.

5.8 Annexe au chapitre: Expérience d'échange bidimensionnelle en RMN ^{31}P

Dans le but de déterminer la provenance de la composante non orientée observée sur les spectres ^{31}P des bicouches orientées de DLPC, DMPC et DPPC, nous avons procédé à des expériences d'échange bidimensionnelles en RMN du phosphore-31. La composante non orientée peut provenir soit d'un système multilamellaire dissocié du domaine orienté, ou soit faire partie intégrante du domaine orienté perturbé par le peptide 14-mère via l'induction d'une contrainte de courbure positive à la bicouche, tel que proposé dans le modèle.

5.8.1 Matériel et méthodes

Ces expériences ont été réalisées sur des bicouches de DMPC orientées entre des plaques de verre à 37°C. La formation des membranes modèles est décrite à la section 5.4.3.1 du présent chapitre. Les spectres 2D ^{31}P ont été enregistrés à 121.5 MHz à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300 MHz (Bruker Canada, Milton, Ontario, Canada). L'échantillon a été placé dans une bobine plate faite au laboratoire et inséré dans une sonde statique maison. La séquence d'impulsions de type *NOESY* couramment utilisée pour les expériences d'échange 2D est la suivante: Préparation - 90_x° - Évolution(τ_1) - 90_x° - Échange (τ_m) - 90_x° - Détection (τ_2) (346). Les périodes τ_1 et τ_2 sont les périodes d'évolution et de détection, alors que la période τ_m est la période pendant laquelle le processus d'échange se produit. Les spectres 2D ont été enregistrés à des temps d'échange τ_m de 100 μs , 1 ms et 5 ms. Les impulsions de 90° sur le canal ^{31}P étaient de 6,3 μs , pour un temps de répétition de 2 s et une largeur spectrale de 25 kHz. Typiquement, 512 points ont été enregistrés dans la première dimension, et 128 points dans la deuxième dimension. Le nombre de points dans les deux dimensions a été augmenté à 1024 par addition de zéros. Un total de 320 acquisitions ont été enregistrées pour chaque série du spectre 2D. Les

déplacements chimiques ont été référenciés par rapport à l'acide phosphorique H_3PO_4 85% (0 ppm).

5.8.2 Résultats et discussion

Dans ce projet, les expériences d'échange bidimensionnelles en RMN ^{31}P ont été utilisées pour étudier la diffusion latérale des lipides au sein d'un système membranaire (347). Des études similaires ont été réalisées par Mani et coll. sur des bicouches de POPC/POPG orientées entre plaques de verre et en interaction avec le peptide protegrin-1. Les expériences 2D d'échange en RMN ^{31}P leur ont permis de déterminer que la phase isotrope observée sur les spectres des échantillons orientés était séparée du domaine lamellaire orienté (334). Buffy et coll. ont également fait des expériences 2D d'échange en RMN ^{31}P pour déterminer la taille des structures non orientées observées sur les spectres d'échantillons orientés de POPC/POPG en interaction avec le peptide RTD-1 (332). L'observation d'intensité hors-diagonale significative à un temps d'échange de 400 ms leur ont permis de déterminer que la taille des structures non orientées était de l'ordre du micron.

Pour un système membranaire volumineux de la taille du micron comme les vésicules multilamellaires, un lipide orienté à 0° prendra un certain temps pour diffuser latéralement sur la bicouche et atteindre une position où son orientation sera de 90° . À l'inverse, les lipides affectés par une contrainte de courbure positive dans une bicouche lipidique plane prendront moins de temps pour passer d'une orientation à 0° à une orientation de 90° , tel que représenté qualitativement à la Figure 5.8.



Figure 5.8: Distance parcourue par un lipide lors de la diffusion latérale (a) dans une vésicule multilamellaire et (b) dans le pore toroïdal d'une bicouche lipidique plane.

Sur les spectres 2D, la diffusion latérale des lipides se manifeste par la présence d'une intensité hors-diagonale aux déplacements chimiques des deux sites couplés. Il a été démontré dans la littérature que pour des vésicules multilamellaires de DMPC, un temps d'échange minimal de 10 ms donne lieu à la présence d'intensité hors-diagonale significative, et que cette intensité augmente avec le temps d'échange (348). Ainsi, en choisissant des temps d'échange relativement courts, et compte tenu du fort rayon de courbure d'une contrainte de courbure positive, comparativement au rayon moyen des vésicules multilamellaires, il est possible de préciser davantage la provenance de la composante non orientée sur les spectres ^{31}P des bicouches orientées entre plaques de verre. Les spectres d'échange 2D pour ces deux temps d'échange sont illustrés à la Figure 5.9.

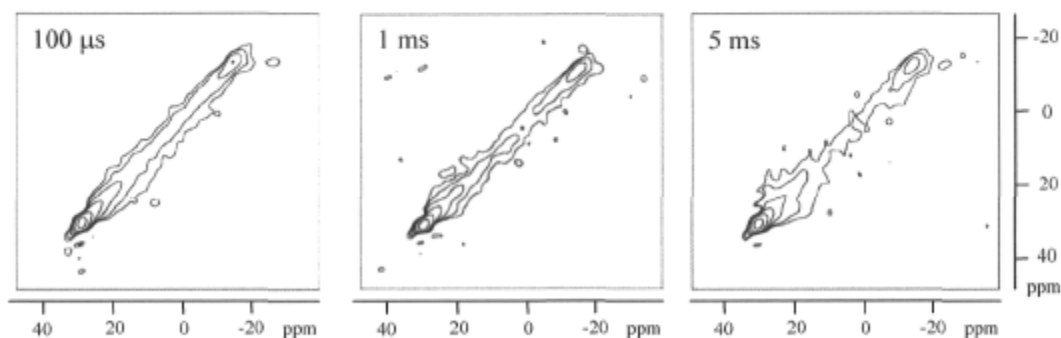


Figure 5.9 : Spectres d'échange 2D en RMN ^{31}P pour des bicouches orientées de DMPC à des temps d'échange de 100 μs , 1 ms et 5 ms.

À la Figure 5.9, nous constatons qu'il n'y a aucune intensité hors-diagonale entre les composantes à 0° (31 ppm) et à 90° (-15 ppm) pour les temps d'échange de 100 μ s, 1 ms et 5 ms. Nous pouvons donc conclure que le temps de diffusion latérale des lipides est supérieur à 5 ms. Malgré l'absence d'intensité hors-diagonale entre les composantes à 0° et à 90° , nous constatons que pour un temps d'échange de 5 ms, il y a un élargissement de l'intensité sur la diagonale, et l'élargissement de la composante orientée à 0° est plus important que celui de la composante orientée à 90° . À la lumière des résultats obtenus par ces expériences d'échange bidimensionnelle en RMN ^{31}P , nous ne pouvons pas identifier avec certitude la provenance de la composante non orientée observée sur les spectres ^{31}P des bicouches orientées. En effet, l'absence d'intensité hors-diagonale peut provenir de structures multilamellaires non orientées et dissociées du domaine orienté. Elle peut aussi provenir de la grande différence d'intensité entre les composantes à 0° et 90° . Cette différence est observée sur les spectres 1D de la Figure 5.2(b) pour les bicouches orientées de DMPC. L'absence d'intensité hors-diagonale peut s'expliquer par le fait qu'il est beaucoup plus difficile de générer de l'intensité hors-diagonale pour la composante à 90° , qu'il ne l'est pour la composante à 0° affichant une intensité beaucoup plus importante.

Chapitre 6

Solid-State NMR Study of the Membrane Interactions of a 21-mer Cytotoxic Model Peptide

Marise Ouellet, Normand Voyer et Michèle Auger

En préparation, 2007

6.1 Résumé

Nous avons étudié les interactions membranaires d'un peptide cytotoxique modèle 21-mère possédant une activité de canal ionique par spectroscopie de RMN à l'état solide. Le peptide amphiphile et hélicoïdal 21-mère est composé d'une alternance de résidus leucine et phénylalanine modifiée par l'addition d'éthers en couronne. Pour en apprendre davantage sur son mode de perturbation membranaire, nous avons procédé à des expériences de RMN ^{31}P et ^2H sur des bicelles de DMPC et DPPC contenant le peptide 21-mère. Les résultats obtenus en RMN ^{31}P indiquent que le peptide 21-mère stabilise à la fois la structure et l'orientation des bicelles dans le champ magnétique, et qu'il perturbe la conformation des têtes polaires des lipides. Les spectres de RMN ^2H révèlent quant à eux une stabilisation des chaînes acyle des lipides DMPC et DPPC lors de l'interaction avec le peptide 21-mère. Des expériences en RMN ^{15}N démontrent également que le peptide 21-mère s'adsorbe à la surface des bicouches de DMPC orientées entre des plaques de verre. Lorsqu'incorporé à des bicelles de DMPC, les expériences en RMN ^{15}N indiquent que le peptide 21-mère n'adopte pas une distribution d'orientation circulaire à la région planaire des bicelles. Finalement, la RMN ^{13}C nous a fourni de l'information sur la dynamique du peptide 21-mère incorporé à des vésicules de DMPC. Par l'analyse des bandes de rotation de la fonction ^{13}CO du peptide, les résultats en RMN ^{13}C démontrent que le peptide est immobilisé dans la bicouche lipidique. À la lumière de cette étude, nous sommes en mesure de proposer un modèle d'interaction où l'orientation membranaire de plus faible énergie du peptide 21-mère est en surface des bicouches, et il perturbe la conformation des têtes polaires des phospholipides.

6.2 Abstract

We have investigated the membrane interactions of a 21-mer cytotoxic model peptide that acts as an ionic channel by solid-state NMR spectroscopy. The amphipathic helical peptide is an oligomer of a repeating unit of leucines and phenylalanines bearing crown ethers. To shed light on its mechanism of membrane perturbation, we have performed ^{31}P and ^2H NMR experiments on the 21-mer peptide-containing bicelles composed of DHPC and DMPC or DPPC. ^{31}P NMR results indicate that the 21-mer peptide stabilizes the bicelle structure and orientation in the magnetic field, and perturbs the lipid polar headgroup conformation. On the other hand, ^2H NMR spectra reveal that the 21-mer peptide orders both the DMPC and DPPC acyl chains upon binding. ^{15}N NMR experiments performed in DMPC bilayers stacked between glass plates also reveal that the 21-mer peptide remains at the bilayer surface. ^{15}N NMR experiments in perpendicular DMPC bicelles indicate that the 21-mer peptide does not show a circular orientational distribution in the bicelle planar region. Finally, ^{13}C NMR experiments were used to study the 21-mer peptide dynamics in DMPC multilamellar vesicles. By analysing the ^{13}CO spinning sidebands, the results show that the 21-mer peptide is immobilized upon membrane binding. In light of these results, we propose a model of membrane interaction for the 21-mer peptide where it lies at the bilayer surface, which is the energetically most favorable state, and perturbs the lipid headgroup conformation.

6.3 Introduction

The study of membrane-active peptides has become the focus of many research groups since they represent potential antimicrobial agents acting as substitutes to ineffective antibiotics for which bacteria have developed resistance mechanisms (1, 4, 8, 9, 65). Part of the defense system of many living organisms, natural membrane-active peptides share common properties such as their small size, and their cationic and amphipathic characters, the latter being essential to their interactions with amphipathic lipid bilayers (16, 17, 56). When interacting with membranes, antimicrobial peptides can adopt

different secondary structures, such as α -helix, β -sheet and extended conformations (24, 25), and their membrane interactions can be modulated by varying peptide structural parameters such as helicity, charge, hydrophobicity, and amphipathicity (56, 77).

Most of antimicrobial peptides possess a broad spectrum of activity, i.e. acting on viruses, bacteria, and fungi (17, 18). However, peptides such as melittin, magainin, lactoferricin B, cecropin B, and citropin 1.1 show cytotoxic properties against mammalian cells by lysing erythrocytes and killing cancer cells (46, 47, 349-354). Based on extensive studies of natural and synthetic membrane-active peptides, general modes of action are reported in the literature, namely the carpet-like, the barrel-stave, and the toroidal models (29, 54, 55). Because these mechanisms of membrane perturbation are not fully understood and still under debate, the focus is then turned on the studies of antimicrobial peptides in interaction with model and biological membranes to get more information on the interactions underlying these mechanisms (23, 29, 39, 65). A better understanding of how membrane-active peptides interact with bilayers opens the way to the design of novel membrane-active agents that possess the desired specific biological action, being cytotoxic and/or antimicrobial (323, 355, 356).

Membrane-active peptides, such as melittin, alamethicin, cecropin, and magainin for which membrane perturbation mechanisms are mostly studied, may permeabilize lipid bilayers by either the membrane disintegration into small structures and/or by the formation of discrete pores that dissipate ion gradients (39, 54, 65, 71, 74, 357). Inspired by the great antimicrobial and cytotoxic potentials of membrane-active peptides as novel therapeutic agents, many research groups have focused on the design of synthetic ion channels with the aim to better understand both structural features and the types of interactions involved in the channel activity (257, 350, 358, 359). In this way, we have designed and synthesized a synthetic helical amphipathic peptide composed of 21 amino acids (90, 100, 101). The 21-mer peptide is a trimer of a repeating unit of five leucine residues and two synthetic 21-crown-7-phenylalanines judiciously positioned so that the hydrophilic crown ethers align

on one side of the hydrophobic helix under a helical conformation, giving rise to an amphipathic peptide structure (Figure 6.1).

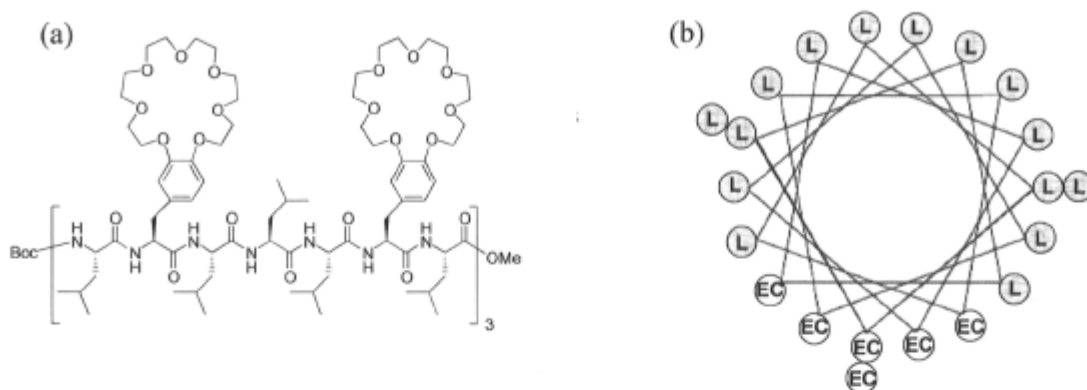


Figure 6.1: (a) Diprotected 21-mer peptide structure used in this study. (b) Edmundson wheel projection showing the amphipathic character of the 21-mer peptide under a helical conformation.

Previous studies revealed that the 21-mer peptide acts as an artificial ion channel when incorporated into lipid bilayers (100, 101). To shed light on their membrane properties similar to natural membrane-active peptides acting as ion channels, we have studied the interactions between the 21-mer peptide and model membranes by solid-state NMR spectroscopy. Solid-state NMR is a well-suited technique to study both the lipid bilayers and peptides by taking advantage of the orientational dependence of anisotropic nuclear spin interactions in the static mode (133, 193, 360). Alternatively, magic-angle spinning (MAS) is commonly used to obtain high resolution NMR spectra that allow the study of peptide structure and dynamics (214, 217, 220). Many examples of the study of membrane perturbation induced by membrane-active peptides using solid-state NMR are reported in the literature. In fact, there are extensive solid-state NMR studies on natural antimicrobial peptides such as magainins, alamethicin, cecropins, human peptide LL-37, subtilisin A (163, 298, 337, 339, 361), as well as on analogues of the magainin family (296, 306, 329, 345), and on synthetic peptides (324, 325, 341, 362).

In this study, we report the membrane interactions of the 21-mer peptide with oriented model membranes. More specifically, static ^{31}P NMR spectroscopy has been used to determine the magnetic orientation of DMPC and DPPC bicelles, and the lipid polar headgroup conformation upon the 21-mer peptide binding, whereas static ^2H NMR experiments have been used to investigate DMPC and DPPC lipid acyl chain orientational order. Subsequently, ^{15}N NMR experiments have been performed on both DMPC bicelles and bilayers stacked between glass plates to determine both the peptide rotational diffusion and membrane orientation. Finally, ^{13}C NMR experiments have allowed the study of the 21-mer peptide dynamics when incorporated to multilamellar DMPC vesicles by the analysis of spinning sideband intensity. The results are in agreement with a model of membrane interaction where the helicoidal peptide binds parallel to the bilayer surface, does not show a circular orientational distribution around the bilayer normal, and perturbs the lipid polar headgroup conformation.

6.4 Materials and methods

6.4.1 Materials

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) with protonated and deuterated (d_{54}) acyl chains, dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC), and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and used without purification. Oxime resin was prepared by a standard procedure using polystyrene beads (100-200 mesh 1% DVB, Advanced ChemTech, Louisville, KY) (307). Resins with substitution levels around 0.5 mmol per gram of oxime group were used. Boc-protected amino acids were purchased from Advanced ChemTech (Louisville, KY). The ^{15}N and ^{13}CO leucine residues were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). All solvents were Reagent, Spectro, or HPLC grade quality purchased commercially and used without any further purification except for DMF (degassed with N_2), dichloromethane (distilled), and diethyl ether (distilled from sodium and benzophenone). Water used throughout the studies was distilled and deionized using a Barnstead

NANOpurII system (Boston, MA) with four purification columns. All other reagents were purchased from Sigma Aldrich Co. (Milwaukee, WI).

6.4.2 Peptide synthesis

The unlabeled and ^{15}N , ^{13}C -labeled diprotected 21-mer peptides (Figure 1(a)) were synthesized and purified according to published procedures (90). The N-terminal region of the 21-mer peptide is Boc-protected while the C-terminal region is acetylated (Figure 6.1(a)). Previous membrane activity studies have been done on various 21-mer peptides with different N- and C-endings, and the results indicate that the N-Boc and C-acetylated 21-mer peptide show the greatest ion channel activity (Biron et al., unpublished results).

6.4.3 Sample preparation

6.4.3.1 Bicelles

Bicelle samples were prepared by mixing 20 mg of long chain phospholipids (DMPC or DPPC) with DHPC to achieve desired long:short-chain phospholipid ratios ($q = 3.5$ for DMPC, $q = 3.0$ for DPPC) before sample hydration (160). For ^2H NMR experiments, 5 mg of deuterated DMPC- d_{54} and DPPC- d_{62} was used to replace 5 mg of undeuterated lipids. A total of 80 μL of deuterium-depleted water was used, giving a total proportion of 20% (w/w) lipids in water, and the pH was ~ 6.5 in all samples. The 21-mer peptide was added after the bicelle formation and hydration in a lipid/peptide molar ratio of 60:1. The bicelle samples then underwent at least three freeze (liquid N_2)/thaw (37°C for DMPC; 50°C for DPPC)/vortex shaking cycles, and were stored at -20°C until analysis. Three additional freeze/thaw/vortex cycles were performed before the acquisition of NMR spectra.

6.4.3.2 Oriented bilayers stacked between glass plates

The DMPC bilayers were prepared by dissolving 30 mg of phospholipids in 120 μL of chloroform, and the solution was deposited onto 18 thin cover glasses. The glass plates were allowed to dry in air for 24 h, and then stacked and hydrated with deionized water in a closed chamber for at least 24 h at 70°C. Subsequently, the plates were wrapped in Parafilm before use. For the preparation of the peptide-containing bilayers, the dry 21-mer peptide was co-dissolved with dry lipids in chloroform in a lipid/peptide molar ratio of 60:1. Since the lipids found in natural membranes are in the fluid phase, the NMR spectra of mechanically oriented bilayers have been obtained at a temperature above the lipid phase transition, i.e. at 37°C for DMPC bilayers.

6.4.3.3 Multilamellar vesicles

Multilamellar vesicles were prepared by co-dissolving 30 mg of DMPC and 10 mg of doubly labeled [^{15}N]Leu₁₅-[^{13}C]Leu₁₈-21-mer peptide in chloroform to ensure homogeneity of the lipid/peptide mixture. The solvent was removed under nitrogen gas, followed by storage under vacuum overnight to remove all traces of organic solvent. The dry sample was hydrated with 46 μL of deionized water with 40% (w/w) lipids in water. The vesicle samples then underwent at least three freeze (liquid N₂)/thaw (37°C)/vortex shaking cycles, and were stored at -20°C until analysis. Three additional freeze/thaw/vortex cycles were performed before the acquisition of ^{13}C NMR spectra.

6.4.4 NMR experiments

6.4.4.1 Static ^{31}P and ^2H NMR experiments

The static ^{31}P and ^2H NMR spectra of the 21-mer peptide incorporated in bicelles and in mechanically oriented DMPC bilayers were acquired with a Bruker Avance 300 MHz spectrometer (Bruker Biospin Ltd., Milton, Ontario, Canada). The bicelle samples were placed into a 5-mm coil of a homebuilt probe. The thin glass plates were inserted into a flat coil of a homebuilt solid-state NMR probehead with the glass plate normal oriented parallel to the magnetic field direction. The ^{31}P NMR spectra of bicelles were obtained at 121.5 MHz using a phase-cycled Hahn echo pulse sequence (308) with TPPM proton decoupling (309). The ^{31}P NMR spectra of oriented DMPC bilayers were acquired with TPPM proton decoupling. Using 4096 data points, typically 1200 scans were acquired with a pulse length of 4 μs , an interpulse delay of 30 μs , and a recycle delay of 4 s. A line broadening of 50 Hz was applied to all static ^{31}P spectra. The chemical shifts were referenced relative to external H_3PO_4 85% (0 ppm). The ^2H NMR experiments were carried out at 46.1 MHz using a quadrupolar echo sequence (195). The 90° pulse length was 5 μs and the interpulse delay was 60 μs . Using 2048 data points, typically 3200 scans were acquired, and the recycle time was set to 500 ms. A line broadening of 100 Hz was applied to all spectra. A 1800 second equilibration delay was allowed between each temperature in the ^{31}P and ^2H experiments.

6.4.4.2 Static ^{15}N NMR experiments

The static ^{15}N NMR spectra of the 21-mer peptide incorporated in bicelles and in glass plates were acquired with a Bruker Avance 300 MHz spectrometer (Bruker Biospin Ltd., Milton, Ontario, Canada). The bicelle sample was placed into a 7-mm coil of a Bruker MAS probe, whereas the glass plate sample was inserted into a flat coil of a homebuilt solid-state NMR probehead with the glass plate normal oriented parallel to the magnetic

field direction. The ^{15}N NMR spectra were obtained at 30.4 MHz using a cross-polarization (CP) pulse sequence with TPPM proton decoupling (309). Using 2048 data points and a recycle delay of 4 s, between 100 000 and 200 000 scans were acquired with a ^1H - ^{15}N CP contact time of 1.5 ms and 3.0 ms for the 21-mer peptide in bicelles and in oriented DMPC bilayers. The spectral width was 30 kHz and a line broadening of 300 Hz was applied to all ^{15}N oriented spectra. The chemical shifts were referenced relative to external $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (41.5 ppm) corresponding approximately to 0 ppm for liquid NH_3 .

6.4.4.3 MAS ^{13}C NMR experiments

^{13}C NMR spectra were acquired with a Bruker Avance 400 MHz spectrometer (Bruker Biospin Ltd., Milton, Ontario, Canada). The samples were placed into a 4-mm NMR tube inserted into a MAS probe. The ^{13}C NMR spectra were obtained at 100.6 MHz using a ramped cross-polarization pulse sequence with TPPM proton decoupling (309). The ramp used 100 linearly increasing rf amplitudes and was applied on the ^1H channel. A short CP contact time of 0.5 ms was used to minimize lipid background signals. The spinning speeds were set to 5000 Hz, and to 2500 Hz to generate spinning sidebands. Using 2048 data points, between 5 000 and 10 000 scans were acquired with a recycle delay of 4 s. The spectral width was 50 kHz and a line broadening of 150 Hz was applied to all ^{13}C NMR spectra. The acquisition temperature for hydrated samples was set to 37°C. The chemical shifts were referenced relative to tetramethylsilane (TMS) at 0 ppm.

6.5 Results and discussion

6.5.1 Peptide design

The rational design of the 21-mer peptide was to use a peptidic framework sufficiently hydrophobic to be incorporated in lipid bilayers and long enough to span the bilayer without hydrophobic mismatch. Leucine and phenylalanine residues have been chosen as constituents of the peptide backbone because of their relatively high hydrophobic moment and propensity to favor a α -helical structure. The helical conformation of the 21-mer peptide has been confirmed by circular dichroism spectropolarimetry (100). Also, phenylalanine residues have been modified to add 21-crown-7 macrocyclic ethers on the benzene ring, as illustrated in Figure 6.1(a). The 21-crown-7 ethers were incorporated judiciously at positions 2, 6, 9, 13, 16, and 20 in the amino acid sequence to lead to their alignment under such a α -helical conformation. In addition, 21-crown-7 ligand binds alkali metal ions rather poorly, which is a prerequisite for an ionic channel activity, and their binding ability can be engineered by their size modulation (95, 96). The spatial segregation of polar 21-crown-7 ethers on one side of the helix and the hydrophobic leucine side chains on the other side confers to the 21-mer peptide an amphipathic character essential to its interaction with amphipathic membranes (Figure 6.1(b)). Assuming that the 21-mer adopts a perfect α -helical conformation with 1.5 residues per turn and a helical step of 3.4 Å, its length is 31.5 Å.

The membrane transport activity of the 21-mer peptide has previously been studied by ^{23}Na NMR, fluorescence spectroscopy, pH-stat, and monomolecular membrane conductivity. Based on the differentiation of Na^+ inside and outside lipid vesicles by the use of Dy^{3+} as shift reagent, ^{23}Na NMR studies have revealed that the 21-mer peptide incorporated in PC/PG vesicles allows an exchange of Na^+ across the bilayer similar to the parent 14-mer peptide investigated in our research group (90). However, fluorescence studies revealed that the 21-mer peptide does not release calcein from PC/PG vesicles in a

similar way that the 14-mer peptide does (97). These results confirmed that the activity observed in the ^{23}Na NMR assay reflects the transport ability of the 21-mer artificial channel. To further characterize the transport ability of the 21-mer peptide, both pH-stat and monomolecular membrane conductivity experiments have been performed in PC/PA/cholesterol and DPPC bilayers (100, 101). Both experiments revealed that the 21-mer peptide exhibits transport activity for Cs^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , and Rb^+ ions, and shows typical discrete conductance steps of 3.5 ± 0.2 pA with open state lifetimes around 1 s. Preliminary antimicrobial and cytotoxicity studies have also been done on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negative bacteria, on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* Gram-positive bacteria, on breast cancer cells (MDA), and on mouse leukemia cells (P388) (90). No antimicrobial activity was found for the 21-mer peptide, whereas it shows some activity against cancer cells. In addition, the 21-mer peptide activity on human red blood cells revealed that the 21-mer peptide releases hemoglobin from erythrocytes at a minimal concentration of 8 μM , which is twice the minimal concentration observed for the 14-mer peptide to cause the same biological effect (Biron et al., unpublished results). In light of the membrane activity of the 21-mer peptide in both model membranes and cells, ^{31}P and ^2H NMR experiments on unoriented zwitterionic and anionic vesicles were performed (330). The results showed that the 21-mer peptide affects the lipid polar headgroup conformation, whereas it does not affect the lipid acyl chain order.

6.5.2 Solid-state NMR spectroscopy

6.5.2.1 Phosphorus-31 NMR

Since the phospholipid headgroup contains a phosphorus-31 atom with 100% natural isotopic abundance, ^{31}P NMR is a powerful technique to monitor dynamics and/or orientational changes at the polar region of lipid bilayers (197, 198, 291). In the present study, we have used ^{31}P NMR spectroscopy to investigate the quality of magnetic

orientation of bicelles composed of different long-chain lipids, namely DMPC and DPPC, upon the 21-mer peptide addition, as well as conformational changes occurring at the bicelle headgroup region. These experiments are of great interest since bicelles are well-hydrated bilayers and represent a good way to orient peptides in the magnetic field prior to rotational diffusion and membrane topology studies (145, 152, 171, 363). The choice of long chain lipids with different acyl chain lengths was aimed to determine the effect of the bilayer hydrophobic thickness on the membrane interaction of the 21-mer peptide. The DMPC and DPPC bicelle thicknesses are evaluated to be 23.0 Å and 26.0 Å, respectively (160).

More specifically, static ^{31}P NMR spectra provide information on bicelle orientation and on the dynamics and/or orientation of the lipid polar headgroup by analyzing changes in the chemical shift (δ , ppm), in the linewidth, and in the spectral lineshape. Picard et al. proposed a way to quantitatively assess the level of mosaic spread of bicelles by evaluating a relative order parameter of the form (199, 200):

$$S_l = S_{dist} \times S_{tilt} \quad (6.1)$$

where

$$S_{dist} = \frac{(M_1 - \delta_{iso})}{\delta} \quad (6.2)$$

The S_{dist} term is defined as a distribution order parameter. M_1 is the first spectral moment of ^{31}P NMR spectra representing the weighted-average DxPC spectral frequency, and δ_{iso} and δ are the DxPC isotropic chemical shift and the chemical shift anisotropy, DxPC being either DMPC or DPPC lipids. The S_l order parameter for perpendicular bicelles is obtained by multiplying the S_{dist} order parameter by a S_{tilt} order parameter value of -0.5. Any deviation of the S_l order parameter from the -0.5 value indicates that the bicelle orientation deviates from the perfect perpendicular orientation. Picard et al. also

monitored changes in the lipid headgroup dynamics and/or orientation by measuring a relative order parameter of the form:

$$S_2 = \frac{\delta}{\delta_{ref}} \quad (6.3)$$

in which δ and δ_{ref} are the D_xPC chemical shift anisotropies of the peptide-containing and pure bicelles (200). The S_2 order parameter is equal to 1 for peptide-containing bicelles in which the dynamics is the same as in the reference system, and to 0 for a totally isotropic system. A S_2 value greater than 1 may also be obtained for a less dynamic lipid system compared to the pure lipid system. As previously reported, bicelles are represented as discoid bilayers or perforated lamellae that spontaneously align with the bilayer normal perpendicular to the magnetic field direction (136, 180, 182). In the temperature range of bicelle orientation, two well-resolved resonances are observed in ³¹P NMR spectra (151, 153). The downfield and upfield resonances are mainly attributed to short-chain lipids (DHPC) located on the bicelle torus, and to long-chain lipids (DMPC or DPPC) located in the planar region (136, 138, 153, 182), respectively. In a general manner, downfield (upfield) shifts of the resonances upon peptide addition could originate from changes in the phosphorus nucleus environment by the interaction with peptide deshielding (shielding) moieties or from changes in headgroup orientation and/or dynamics.

³¹P static NMR spectra and related spectral parameters of pure and peptide-containing bicelles are displayed in Figure 6.2 and Table 6.1. Oriented bicellar systems are known to exist in a specific temperature range over the long-chain lipid phase transition temperature T_m , and their structure and orientation are function of the bicelle size and lipid composition (151, 159, 176). ³¹P NMR spectra of DMPC and DPPC bicelles have been recorded at different temperatures above T_m to probe the 21-mer peptide effect in the temperature range in which bicelles conserve their structure and perpendicular orientation. ³¹P NMR spectra of DMPC bicelles have been recorded at 30°C, 35°C, 37°C, and 40°C, whereas ³¹P spectra of DPPC bicelles have been recorded at 40°C, 42°C, 45°C, and 47°C.

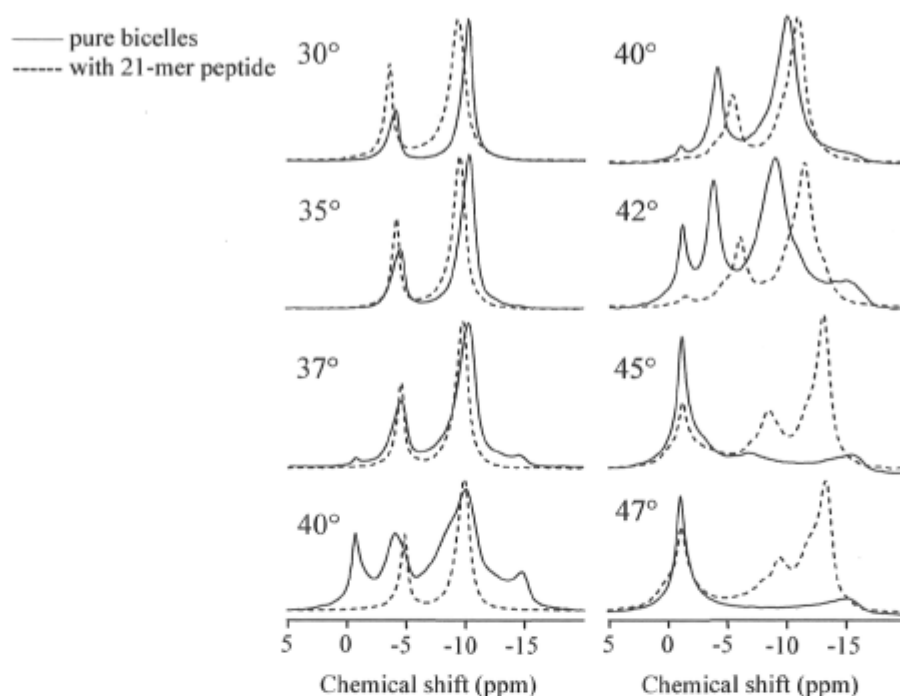


Figure 6.2: ^{31}P static NMR spectra of DMPC (*left*) and DPPC (*right*) bicelles at different temperatures, and in the absence and presence of the 21-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

Table 6.1: ^{31}P NMR spectral parameters of bicelles in the absence and presence of the 21-mer peptide. DxPC represents DMPC or DPPC lipids. Data are reported at 35°C for DMPC bicelles, and at 40°C for DPPC bicelles. The lipid/peptide molar ratio is 60:1.

System	DHPC (δ , ppm)	DxPC (δ , ppm)	S_1	S_2
DMPC bicelles	-4.6	-10.4	-0.34	0.92
+ 21-mer	-4.3	-9.6	-0.33	
DPPC bicelles	-4.1	-10.1	-0.34	1.1
+ 21-mer	-5.5	-11.0	-0.35	

As shown in Figure 6.2, the ^{31}P NMR spectra of perpendicular bicelles are characterized by the presence of two resonances. In the case of the DMPC bicelles, the DHPC and DMPC resonances are observed at chemical shifts of -4.6 ppm and -10.4 ppm, and the DMPC bicelles are aligned in the magnetic field in the temperature range between 30°C and 37°C. At 40°C, the ^{31}P NMR spectrum of DMPC bicelles is no longer representative of perpendicular bicelles. For DPPC bicelles, DHPC and DPPC resonances appear at -4.1 ppm and -10.1 ppm, and the bicelles are only aligned at a temperature close to the phase transition temperature of the DPPC lipids, namely 40°C. Above that temperature, the bicelle structure is gradually lost leading to the appearance of an isotropic resonance at -1.0 ppm. The addition of the 21-mer peptide to DMPC and DPPC bicelles seems to stabilize the structure and prevents the bicelles to break into micelles or multilamellar vesicles. This is reflected in Figure 6.2 where two resonances are still present in the ^{31}P NMR spectra of DMPC (*left*) at 40°C, and of DPPC (*right*) bicelles at 42°C, 45°C and 47°C upon peptide addition, compared to distorted spectral lineshape of the pure lipid systems at these temperatures. In addition to the bicelle structure stabilization, the 21-mer peptide does not affect significantly the bicelle mosaic spread at temperatures of bicelle existence, with S_l value differences of 0.01 for both DMPC and DPPC bicelles at 35°C and 40°C, respectively. Interestingly, Triba et al. studied the correlation between the propensity of short-chain lipids to diffuse into the bilayer domain composed mainly of long-chain lipids and the alignment property of bicelles by ^{31}P NMR (159). More specifically, by studying spectral lineshapes of DHPC/DLPC and DHPC/DPPC bicelles as a function of temperature for a q ratio of 3.0, they observed that the temperature range in which bicelles align in the magnetic field is related to the propensity of DHPC to diffuse into the bilayer domain, and that miscibility is influenced by the mismatch between lipid chain lengths, the T_m of long-chain lipids, and the affinity of short-chain lipids for the torus. According to the conclusions drawn from Triba's studies, we may suppose that the increase in the temperature range of DMPC and DPPC bicelle orientation upon the 21-mer peptide addition is explained by the fact that the 21-mer peptide decreases the miscibility of DHPC lipids into the DMPC and DPPC bilayer region.

In the temperature range of bicelle orientation, namely, 30-37°C for DMPC bicelles, and 40°C for DPPC bicelles, the ^{31}P NMR spectra showed that the DHPC/DMPC resonances (*left*) are downfield shifted, whereas the DHPC/DPPC resonances (*right*) are upfield shifted upon the 21-mer peptide addition. As shown in Table 6.1, upfield shifts of 0.3(0.8) ppm are reported for DHPC(DMPC) bicelles at 35°C, whereas downfield shifts of 1.4(0.9) ppm are reported for DHPC(DPPC) bicelles at 40°C.

The downfield (upfield) shifts observed for DMPC (DPPC) bicelles could originate from the interaction of phospholipid headgroups with 21-mer peptide deshielding (shielding) moieties, or from changes in headgroup dynamics and/or orientation (156, 330). In the former case, the lipid isotropic chemical shift which is expected to change can be verified by MAS, otherwise the δ_{iso} is unchanged. ^{31}P MAS experiments performed in both bicelle systems indicated that the δ_{iso} and resonance linewidth remain unchanged upon the 21-mer peptide addition (data not shown). The downfield (upfield) shifts observed for DMPC (DPPC) bicelles could therefore be attributed to disorder (order) or to orientational changes in the phospholipid headgroups in interaction with the 21-mer peptide. Similar conclusions were drawn by Marcotte et al. who studied the neuropeptide Menk bound to zwitterionic and anionic bicelles (156). Therefore, it appears that the 21-mer peptide stabilizes the bicelle structure and interacts differently with the lipid polar headgroups in DMPC and DPPC bicelles. Differences in the 21-mer peptide interaction with DMPC and DPPC bicelles could originate from the physical properties of bicelles with various long-chain lipids.

6.5.2.2 Deuterium NMR

We have investigated the effect of the 21-mer peptide on the bicelle hydrophobic core by measuring the quadrupolar splitting $\Delta\nu_Q$ upon the peptide addition. The lipid acyl chain order is related to an order parameter S_{CD} that takes the following form:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) (3\cos^2\theta - 1) S_{CD} \quad (6.4)$$

where e^2qQ/h is the quadrupole coupling constant for C-D bonds (~ 167 kHz) and θ is the angle between the bilayer normal and the magnetic field B_0 (291). An increase (decrease) in the quadrupolar splitting $\Delta\nu_Q$ for a C-D bond in a lipid system with axial symmetry is related to order (disorder) in the deuterated chains (203, 291, 364). Quadrupolar splittings $\Delta\nu_{Q(P)}$ and $\Delta\nu_{Q(M)}$ are calculated for deuterons at the beginning and at the end of the lipid acyl chains, namely, the plateau and terminal methyl regions. The maximal and minimal sizes of $\Delta\nu_{Q(P)}$ and $\Delta\nu_{Q(M)}$ reflect the smallest and highest degree of motion along the lipid acyl chain.

The ^2H NMR spectra and related spectral parameters obtained for pure and peptide-containing DMPC and DPPC bicelles at 35°C and 40°C are displayed in Figure 6.3 and Table 6.2. ^2H NMR spectra exhibit typical lineshapes of perpendicular-aligned bicelles with quadrupolar splittings $\Delta\nu_{Q(P)}$ ($\Delta\nu_{Q(M)}$) of 20.0(2.8) kHz and 19.0(2.4) kHz, and $S_{CD(P)}$ ($S_{CD(M)}$) order parameter values of 0.16 (0.02) and 0.15 (0.02), for DMPC and DPPC bicelles, respectively.

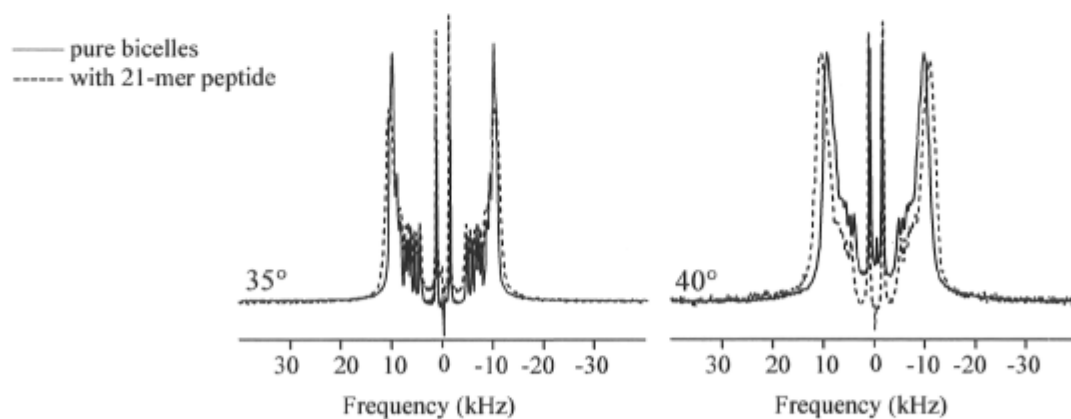


Figure 6.3: ^2H NMR spectra of DMPC (*left*) and DPPC (*right*) bicelles at 35°C and 40°C in the absence and presence of the 21-mer peptide at a lipid/peptide molar ratio of 60:1.

Table 6.2: Quadrupolar splittings and S_{CD} order parameters of DMPC-d₅₄ and DPPC-d₆₂ bicelles at the plateau and methyl regions in the absence and presence of the 21-mer peptide. $\Delta\nu_Q$ and S_{CD} data are reported for DMPC and DPPC bicelles at 35°C and 40°C, respectively. The lipid/peptide molar ratio is 60:1.

System	$\Delta\nu_{Q(P)}$ (kHz)	$\Delta\nu_{Q(M)}$ (kHz)	$S_{CD(P)}$	$S_{CD(M)}$
DMPC bicelles	20.0	2.8	0.16	0.02
+ 21-mer	21.0	2.6	0.17	0.02
DPPC bicelles	19.0	2.4	0.15	0.02
+ 21-mer	21.6	2.8	0.17	0.02

Upon the 21-mer peptide addition at a lipid/peptide molar ratio of 60:1, the $\Delta\nu_{Q(P)}$ and $S_{CD(P)}$ values increase by 1.0 kHz and 0.01 for DMPC bicelles, whereas the effect is even more pronounced in DPPC bicelles with $\Delta\nu_{Q(P)}$ and $S_{CD(P)}$ increases of 2.6 kHz and 0.02. In both bicelle systems however, $\Delta\nu_{Q(M)}$ and $S_{CD(M)}$ does not change significantly, with a slight decrease (increase) of 0.2 (0.4) kHz in DMPC (DPPC) bicelles and unchanged S_{CD} order parameter values of 0.02. These results suggest that the model peptide interacts preferentially at the bilayer surface, ordering the plateau region and/or favoring the perpendicular orientation of the bicelles in the magnetic field.

Similar observations were made by Dufourc et al. who studied the membrane interaction of melittin and δ -lysin peptides in DPPC vesicles (292, 293). By studying the effect of the peptides on the quadrupolar splittings of DPPC vesicles as a function of temperature, they concluded that the peptide positioning may depends on the physical state of the lipids, the peptide being located at the bilayer surface, capping the polar headgroup and leading to a greater acyl chain packing, or the peptide being inserted into the bilayer, acting as a spacer and disordering the lipid acyl chains. The temperature dependence of peptide location has also been observed for the human antimicrobial peptide LL-37 by Henzler-Wildman et al., and their results showed the influence of the acyl chain order on the extent of ordering/disordering of the bilayer hydrophobic region by the peptide (300). In light of these facts, the increase in the $\Delta\nu_{Q(P)}$ may suggest that the 21-mer peptide is located at the bilayer surface of DMPC and DPPC bicelles, caps the lipid molecules and

reduces the lipid acyl chain motion. However, the greater ordering of the DPPC plateau region could be explained by a peptide location closer to the DPPC bicelle interface than in DMPC bicelles. The peptide location in DMPC and DPPC bicelles may be explained by the difference in the bicelle fluidity and temperature. In fact, the ^2H NMR spectrum of DMPC bicelle has been recorded at 35°C which is 12°C above the T_m of DMPC lipids, whereas the ^2H NMR spectrum of DPPC bicelles has been recorded at the T_m of DPPC lipids. At these temperatures, the DMPC bicelles are then considered to be more fluid than the DPPC bicelles.

6.5.2.3 Nitrogen-15 NMR

^{15}N NMR spectroscopy is commonly used to determine the membrane topology of peptide and proteins bound to lipid membranes, as well as rotational diffusion rates. Due to the size and orientation of the σ_{33} ^{15}N chemical shift tensor element, ^{15}N NMR experiments enable the determination of membrane orientation of helical peptides embedded in bilayers aligned with their normal parallel to the magnetic field direction (131, 327). Because the peptide rotational diffusion around the bilayer normal does not change the peptide orientation relative to the magnetic field direction, ^{15}N NMR experiments enable the correlation between the peptide ^{15}N chemical shift and its membrane orientation (210). Therefore, chemical shifts below 100 ppm or higher than 200 ppm are expected for helical peptides laid at, or perpendicular to the bilayer surface, respectively. In the bilayer perpendicular orientation however, peptide rotational diffusion introduces a circular distribution of orientations relative to the magnetic field direction, and ^{15}N NMR spectra are sensitive to that motion (211, 212). High resolution NMR spectra are observed in cases where the rotational diffusion is fast enough to average the CSA, whereas slow rotational diffusion leads to broad resonance line shapes reflecting the peptide orientational distribution (210, 363, 365). In addition to rotational diffusion, peptides in interaction with liquid crystalline bilayers are also subject to wobbling and vibrational motions that may reduce the ^{15}N CSA. In the present study, the membrane orientation of the ^{15}N -labeled 21-

mer peptide has been determined in DMPC bilayers stacked between glass plates, whereas the 21-mer peptide rotational diffusion has been studied in DMPC bicelles.

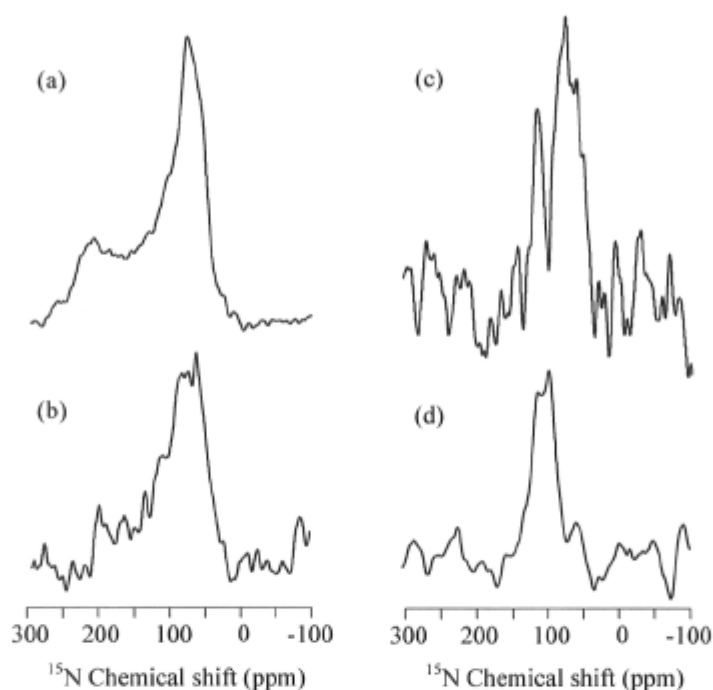


Figure 6.4: ^{15}N NMR spectra of the 21-mer peptide in the (a) lyophilized state, (b) incorporated into DMPC multilamellar vesicles at 0°C , (c) incorporated into DMPC bilayers stacked between glass plates at 37°C , and (d) in DMPC bicelles at 33°C . The lipid/peptide molar ratio is 60:1.

The ^{15}N NMR spectra of the ^{15}N -labeled 21-mer peptide in the lyophilized state and incorporated into DMPC lipid membranes are displayed in Figure 6.4. The two ^{15}N NMR spectra of Figure 6.4 (*left*) are obtained for the 21-mer peptide in the lyophilized state (Figure 6.4(a)) and into unoriented DMPC vesicles at 0°C (Figure 6.4(b)). The ^{15}N spectrum of the lyophilized 21-mer peptide recorded at ambient temperature is characteristic of a static amide group with a ^{15}N CSA of approximately 185 ppm. When incorporated into DMPC vesicles, the sample temperature has been set to 0°C to minimize molecular motions that may interfere with an efficient CP. Under such experimental conditions, the amide group exhibits a reduced ^{15}N CSA of approximately 165 ppm. These

results indicate that even if the temperature has been lowered to 0°C, the amide group CSA is partially averaged by molecular motions.

To shed light on the 21-mer peptide orientation and rotational diffusion, we have incorporated the ^{15}N -labeled peptide into DMPC bilayers stacked between glass plates with the bilayer normal parallel to the magnetic field direction and in DMPC bicelles. The ^{15}N NMR spectra are displayed in Figure 6.4 (*right*). As observed on the spectrum of the 21-mer peptide incorporated into oriented DMPC bilayers (Figure 6.4(c)), there is the presence of one resonance at a chemical shift of 75.2 ppm, which reflects the 21-mer peptide surface orientation. Intensity in the 25-60 ppm range is in part due to the ^{15}N natural abundance of the lipid headgroup. In addition to the peptide membrane orientation, we have investigated the peptide rotational diffusion in DMPC bicelles (Figure 6.4(d)) by analyzing the ^{15}N NMR spectral lineshape. The ^{15}N NMR spectrum clearly shows the presence of one resonance at a chemical shift of 95 ppm different from the isotropic chemical shift of 120 ppm, and the absence of a powder pattern characteristic of a peptide circular orientational distribution around the bilayer normal. The sharp resonance at 95 ppm suggests that the peptide diffuses rotationally around the bilayer normal sufficiently fast to average the ^{15}N CSA. In fact, depending on the peptide rotational diffusion rate, powder patterns characteristic of a circular distribution with a CSA of approximately 180-50 ppm are expected (212, 365). On the other hand, if the peptide lies on the bicelle planar region and undergoes fast rotational diffusion around the bilayer normal as we suppose in the study, a sharp resonance with a chemical shift of approximately 140 ppm is expected (210, 366), which is far from the value of 95 ppm obtained for the 21-mer peptide in DMPC bicelles. Traaseth et al. observed a similar deviation in the ^{15}N chemical shift of the cytoplasmic domain of the phospholamban peptide that undergoes fast rotational diffusion in lipid bilayers (367). They attributed the deviation from the expected value of ~140 ppm to the presence of complex dynamic motions in the peptide cytoplasmic domain that, in addition to fast rotational diffusion, may scale the chemical shift value.

The peptide may also be localized on the bicelle rim and oriented perpendicular to the bilayer plane. In such an alignment, the σ_{33} chemical shift tensor element is mainly perpendicular to the magnetic field direction, reflecting the ^{15}N chemical shift value of 95 ppm observed on the spectrum.

6.5.2.4 Carbon-13 NMR

^{13}C CP-MAS experiments under rapid and slow magic-angle spinning have been performed to study the 21-mer peptide structure and dynamics bound to hydrated DMPC multilamellar vesicles at 37°C. Under MAS conditions, the ^{13}C NMR spectrum is composed of the isotropic resonance flanked by spinning sidebands separated from each other by the MAS frequency, and the number and intensity of spinning sidebands is a function of the MAS speed. The chemical shift of the isotropic resonance is indicative of the peptide secondary structure in which ^{13}CO values of approximately 175.0 ppm and 173.0 ppm are characteristic of α -helical and β -sheet and/or unstructured components (368). Under slow MAS, several spinning sidebands are present and their number and intensity reflect the size of the peptide carbonyl CSA, which is in turn directly influenced by the ^{13}CO dynamics (215, 223). The ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the [^{13}CO]Leu₁₈-labeled 21-mer peptide both in the lyophilized state and incorporated to hydrated DMPC vesicles are displayed in Figure 6.5.

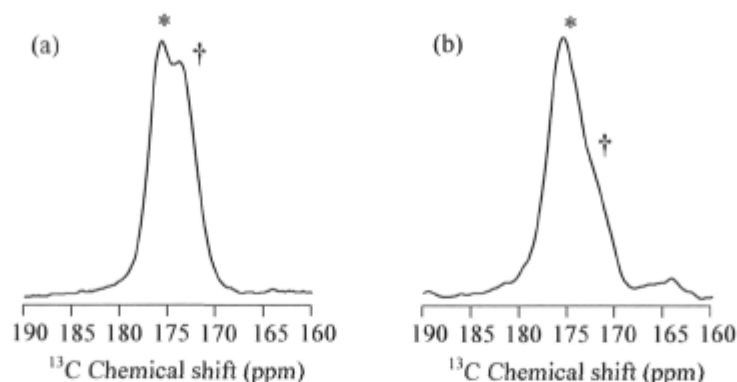


Figure 6.5: ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the $[^{13}\text{CO}]\text{Leu}_{18}\text{-21-mer}$ peptide (a) in the lyophilized state, and (b) incorporated to hydrated DMPC vesicles at 37°C and at a lipid/peptide molar ratio of 10:1. The MAS spinning speed was set to 5000 Hz. The signals marked by * and † indicate isotropic resonance chemical shifts of 175.6 ppm and 172.0 ppm, respectively.

Prior to the peptide dynamics study, we have performed ^{13}C CP-MAS NMR experiments on the 21-mer peptide in the lyophilized state to determine whether the peptide structure is affected by the lipid environment. As observed on the spectrum of Figure 6.5(a), there is the presence of two resonances at isotropic chemical shifts of 175.6 ppm and 172.0 ppm, which are characteristic of α -helical and β -sheet and/or unstructured components, respectively. As shown on the ^{13}C CP-MAS NMR spectrum of Figure 6.5(b,c), upon the peptide incorporation to hydrated DMPC vesicles at 37°C and at a lipid/peptide molar ratio of 10:1, the downfield resonance attributed to the α -helical conformation is more intense and pronounced compared to the resonance at 172.0 ppm. These observations suggest that the 21-mer peptide mainly adopts a α -helical conformation in such conditions. The peptide structure dependence on sample conditions has also been observed for the transmembrane segment of the integral membrane protein phospholamban by Karp et al. (369). They effectively observed that the peptide exhibits both α -helical and β -sheet or unstructured conformations in non-hydrated PC/PG lipid mixtures, whereas the peptide adopts a α -helical conformation in hydrated PC/PG system.

Beside the peptide structure study, the ^{13}C CP-MAS NMR experiments under slow MAS give information on the peptide dynamics when bound to fluid lipid bilayers by the analysis of the number and intensity of the spinning sidebands. Such information is essential to the subsequent determination of the peptide structure by the accurate measurement of intramolecular distances (370). The ^{13}C CP-MAS NMR spectrum of the ^{13}C -labeled 21-mer peptide incorporated to DMPC vesicles at a lipid/peptide molar ratio of 10:1 is displayed in Figure 6.6.

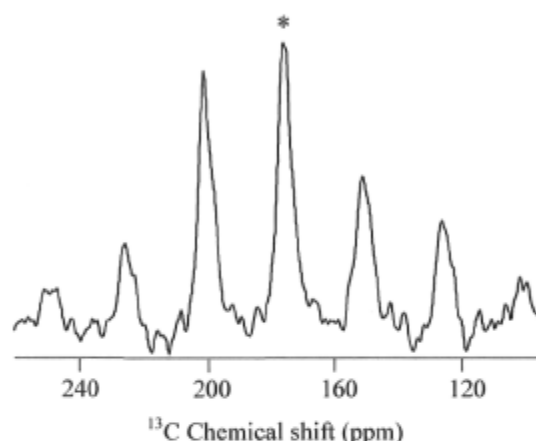


Figure 6.6: ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the [^{13}CO]Leu₁₈-21-mer peptide incorporated to hydrated DMPC vesicles at 37°C and at a lipid/peptide molar ratio of 10:1. The MAS spinning speed was set to 2500 Hz to generate the spinning sidebands. The signal marked by * indicates the isotropic resonance chemical shift of 175.6 ppm.

As shown in Figure 6.6, the number and intensity of spinning sidebands clearly indicate that the 21-mer peptide is immobilized upon its interaction with DMPC bilayers. Such a peptide immobilization may be explained by the peptide aggregation or by binding constraints at a lipid/peptide molar ratio of 10:1. Buffy et al. also observed a similar immobilization of the antimicrobial peptide protegrin-1 incorporated into POPC bilayers at a lipid/peptide molar ratio of 20:1 (224).

6.5.3 Model of membrane perturbation

The aim of the study was to shed light on the membrane interaction of a 21-mer cytotoxic model peptide that acts as an ionic channel by solid-state NMR spectroscopy. A better understanding of such interactions is the first step involved in the design and synthesis of efficient therapeutic agents possessing specific biological activities, being antimicrobial or cytotoxic. ^{31}P and ^2H NMR results on DMPC and DPPC bicelles suggest that the 21-mer peptide stabilizes the bicelle structure. In fact, ^{31}P NMR spectra revealed that the 21-mer peptide increases the temperature range in which bicelles align in the magnetic field. From the ^{31}P resonance lineshapes and S_l order parameter calculation, it seems that the 21-mer peptide does not affect significantly the bicelle mosaic spread at temperatures of bicelle existence. In addition to the ^{31}P NMR, ^2H NMR experiments revealed that the 21-mer peptide stabilizes the DMPC and DPPC bicelle hydrophobic core, the effect being more pronounced on DPPC acyl chains. Also, ^{15}N NMR experiments performed on DMPC bilayers stacked between glass plates and on perpendicular DMPC bicelles suggest that the 21-mer peptide lies at the bilayer surface and undergoes fast rotational diffusion around the bilayer normal. A peptide location on the bicelle rim may also be possible considering the chemical shift value of 95 ppm which suggests that the 21-mer peptide is mainly oriented perpendicular to the magnetic field direction. This hypothesis is also supported by the fact that the peptide length, which is estimated at 31.5 Å, nearly matches the DMPC bicelle hydrophobic thickness. In such a location on the rim, the 21-mer peptide is expected to displace DHPC molecules, and this may increase the DHPC miscibility into the planar region, as suggested by ^{31}P NMR experiments where the integrity of peptide-containing bicelles was maintained over a larger range of temperatures. This model of membrane perturbation is inspired by the “bicycle tire model” proposed by Segrest to account for the structure of discoidal lipid/apolipoprotein complexes (371). Dufourcq et al. also used a similar model to explain discoidal particles resulting from the interaction between the melittin peptide and PC bilayers in the gel phase (63). In such lipid/melittin complexes, peptides are assumed to occupy the bilayer periphery in a parallel

or perpendicular orientation relative to the bilayer plane, the latter case being favored since it allows better packing of helices on the rim surface.

NMR results obtained in the present study allow us to propose a model of membrane interaction for the 21-mer peptide incorporated to lipid bilayers. As illustrated in Figure 6.7, the 21-mer peptide may be either located on the bicelle rim in a perpendicular orientation relative to the magnetic field direction, and/or undergoes fast rotational diffusion around the bilayer normal combined with complex dynamic motions that, in both cases, could account for all NMR results obtained in the present study.

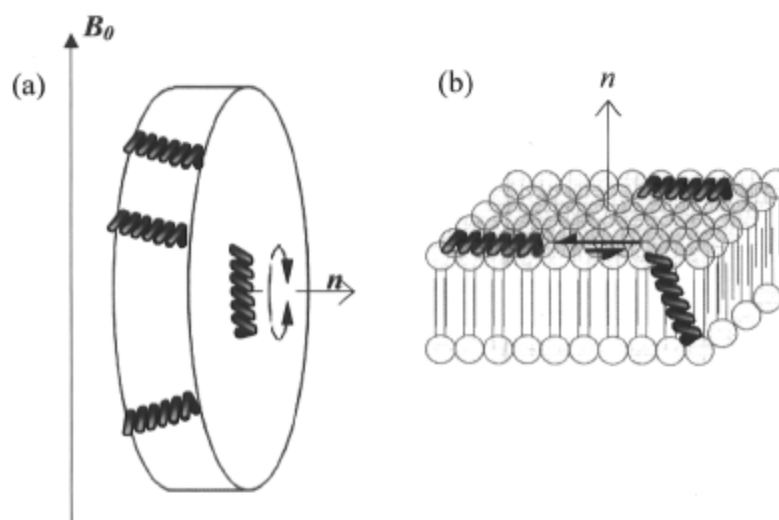


Figure 6.7: Proposed model of membrane interaction for the 21-mer cytotoxic model peptide incorporated to (a) perpendicular bicelles, and (b) to oriented DMPC bilayers. In (a), the 21-mer peptide may be either located on the bicelle rim in an orientation perpendicular to the magnetic field direction, and/or undergo fast rotational diffusion around the bilayer normal in combination to complex dynamic motions. In (b), the 21-mer peptide lies at the bilayer surface in its most favorable membrane orientation, and adopts a transmembrane orientation under specific conditions of electrochemical and electric gradients (91).

This model of membrane interaction in which the 21-mer peptide lies at the bilayer surface and adopts a transmembrane orientation under specific conditions of electrochemical and electric gradients is in agreement with previous attenuated total

reflectance experiments performed by Biron et al. (91). In fact, the ATR results suggested that the 21-mer peptide is not oriented at a fixed angle in the membrane, but rather is in equilibrium between an active transmembrane state and an inactive surface orientation.

6.6 Conclusions

In the present study, we have investigated the membrane interactions of a 21-mer cytotoxic peptide incorporated into model membranes by solid-state NMR spectroscopy. Several model membranes were used, namely DMPC and DPPC bicelles, DMPC bilayers stacked between glass plates, and DMPC multilamellar vesicles. The ^{31}P and ^2H NMR results obtained for the peptide-containing bicelles suggest that the 21-mer peptide perturbs the conformation of lipid polar headgroups and slightly orders the lipid acyl chains. Also, the 21-mer peptide does not affect the bicelle structure, and increases the temperature range in which bicelles align in the magnetic field. On the other hand, ^{15}N NMR experiments on oriented DMPC bicelles and bilayers stacked between glass plates suggest that the 21-mer peptide may adopt a surface orientation and/or be located on the bicelle rim. In addition, ^{13}C NMR experiments performed on the ^{13}C -labeled 21-mer peptide incorporated to DMPC vesicles revealed that the peptide is immobilized upon binding. Based on the NMR results, we propose a model of membrane interaction for the 21-mer peptide where the peptide lies at the bilayer surface, which is the energetically most favorable state, and adopts a transmembrane orientation under specific conditions of electrochemical and electric gradients. However, the possibility exists that only a minor proportion of peptide units exhibit transmembrane orientation leading to stepwise increases of ion conductivity, and to its cytotoxic activity as previously reported (90, 100).

6.7 Acknowledgements

The authors wish to thank Pierre Audet for his technical assistance and helpful discussions. This work was supported by the Natural Science and Engineering Research

Council (NSERC) of Canada, by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), by the Centre de Recherche sur la Structure, la Fonction et l'Ingénierie des Protéines (CREFSIP) and by the Centre de Recherche en Sciences et Ingénierie des Macromolécules (CERSIM). M. O. also wishes to thank NSERC and FQRNT for the award of postgraduate scholarships.

Chapitre 7

Conclusion

Dans le cadre du projet de recherche présenté dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux modes de perturbation membranaire de peptides amphiphiles synthétiques composés de 14 et 21 acides aminés par spectroscopies de RMN à l'état solide et infrarouge. Les interactions membranaires des peptides 14- et 21-mères ont été étudiées dans diverses membranes lipidiques modèles telles que les vésicules multilamellaires, les bicouches orientées entre des plaques de verre et les bicelles. Les résultats présentés aux chapitres 3 à 6 se divisent en deux grandes catégories: l'étude des perturbations induites par les peptides sur les membranes lipidiques modèles et l'étude des contraintes orientationnelles et structurales des peptides en interaction avec les membranes lipidiques.

Plus précisément, la spectroscopie de RMN du phosphore-31 et du deutérium a permis l'étude respective des régions polaires et hydrophobes des membranes caractérisées par les têtes polaires et les chaînes acyle des lipides. De façon complémentaire, la spectroscopie IR-TF a permis de sonder les interactions à la région interfaciale des membranes par l'étude du mode d'élongation du groupement carbonyle de la fonction ester des phospholipides. Par la suite, nous avons procédé à des expériences en spectroscopie de RMN de l'azote-15 pour déterminer l'orientation membranaire des peptides incorporés à des bicouches orientées entre des plaques de verre. Finalement, des études de dynamique membranaire ont été réalisées par spectroscopie de RMN du carbone-13. Dans ce chapitre, nous présenterons les grandes conclusions tirées des expériences de RMN et IR-TF quant aux modes de perturbation membranaire des peptides 14- et 21-mères, et nous discuterons des perspectives liées à l'utilisation à long terme des peptides amphiphiles comme agents antimicrobiens.

7.1 Modes de perturbation membranaire des peptides 14- et 21-mères

Il a été démontré dans des travaux antérieurs que les peptides amphiphiles synthétiques 14- et 21-mères présentent des activités membranaires s'apparentant à celles couramment observées pour les peptides antimicrobiens d'origine naturelle. En effet, le peptide 14-mère perturbe l'intégrité des membranes lipidiques en permettant le relargage de sondes fluorescentes encapsulées dans des vésicules, et la libération de l'hémoglobine des érythrocytes (97). Toutefois, les études préliminaires portant sur son activité antibactérienne se sont avérées négatives. En ce qui a trait au peptide 21-mère, des expériences de conductivité monomoléculaire ont démontré son activité de canal ionique, alors que les études biologiques *in vivo* ont révélé que le peptide 21-mère possède une activité cytotoxique sur les souches de cellules cancéreuses MDA et P388 (90, 100, 101). Devant le potentiel des peptides 14- et 21-mères à titre d'agents antimicrobiens et cytotoxiques novateurs agissant comme perturbateurs membranaires, nous nous sommes intéressés à la nature des interactions impliquées dans les mécanismes d'action de ces peptides dans le but de leur apporter les modifications structurales appropriées à l'activité biologique désirée.

Les résultats présentés dans cette thèse ont démontré que les peptides 14- et 21-mères perturbent de manière considérable la dynamique et/ou l'orientation des têtes polaires, et affectent légèrement l'ordre orientationnel des chaînes acyle des phospholipides (330). Lorsqu'ils sont incorporés à des vésicules multilamellaires, les expériences en RMN ^{31}P ont révélé que les peptides 14- et 21-mères perturbent l'orientation macroscopique des bicouches lipidiques, et que cet effet est diminué en présence de cholestérol, un modulateur naturel de fluidité membranaire. De plus, par RMN ^2H , nous avons constaté que les peptides 14- et 21-mères augmentent très légèrement l'ordre orientationnel des chaînes acyle, et que cet effet est davantage accentué en présence de cholestérol. Par l'analyse du mode d'élongation de la fonction carbonyle du groupement ester des phospholipides, nous avons constaté que la présence des peptides modifie très légèrement le profil d'hydratation des bicouches lipidiques. L'ensemble des résultats portant sur les interactions des peptides

14- et 21-mères laisse suggérer une interaction en surface des peptides, peu importe leur longueur hydrophobe et la composition lipidique des vésicules multilamellaires.

Parallèlement aux études par RMN ^{31}P et ^2H , les expériences en RMN ^{15}N ont permis de déterminer l'orientation membranaire du peptide 14-mère incorporé à des bicouches orientées entre des plaques de verre. Plus précisément, nous avons étudié l'effet de l'épaisseur hydrophobe des bicouches lipidiques sur l'orientation du peptide 14-mère, et les résultats ont démontré que le peptide demeure en surface indépendamment de l'épaisseur des bicouches, et que les perturbations à la tête polaire et aux chaînes acyle sont plus prononcées dans les bicouches de DPPC (372). Les mesures de distances hétéronucléaires intermoléculaires supportent également la proximité du peptide 14-mère avec les têtes polaires des lipides DMPC. L'orientation du peptide 21-mère a quant à elle été déterminée dans les bicouches de DMPC orientées entre des plaques de verre, et les résultats ont révélé que ce peptide comportant une activité de canal ionique adopte une orientation en surface. Nous avons tenté de déterminer la topologie membranaire du peptide 21-mère incorporé à des bicelles dopées aux lanthanides. Les résultats se sont toutefois avérés non concluants compte tenu de la tendance de l'échantillon à précipiter en présence d'ions Yb^{3+} , qu'il y ait l'ajout ou non d'un agent chélatant. Par RMN ^{31}P et ^2H , nous avons également étudié l'effet du peptide 21-mère sur des bicelles de DMPC et DPPC. Les résultats ont démontré que le peptide 21-mère stabilise l'orientation et l'intégrité structurale des bicelles de DMPC et DPPC. De plus, les expériences en RMN ^{15}N sur les bicelles de DMPC dont la normale à la bicouche est perpendiculaire au champ B_0 ont démontré que le peptide 21-mère n'adopte pas une distribution d'orientation circulaire dans le plan des bicelles. Finalement, les résultats obtenus par la RMN ^{13}C suggèrent que le peptide 21-mère est immobilisé dans son interaction membranaire avec des bicouches de DMPC pour un rapport molaire lipide/peptide de 10:1.

En se basant sur l'ensemble des résultats obtenus par les spectroscopies de RMN à l'état solide et IR-TF, nous avons été en mesure de proposer des mécanismes de perturbation membranaire pour les peptides 14- et 21-mères. L'orientation en surface du

peptide 14-mère et sa capacité à perturber l'orientation des lipides orientés entre des plaques de verre suggèrent que le peptide s'adsorbe à la surface des bicouches lipidiques et induit une contrainte de courbure positive à la bicouche (voir Figure 5.6) (97, 372). Cette contrainte serait responsable de l'affaiblissement de la bicouche donnant ainsi lieu aux propriétés « pseudo-lytiques » observées pour le peptide 14-mère. En ce qui a trait au mécanisme d'action du peptide 21-mère, il semble que l'orientation la plus stable du peptide soit en surface. Toutefois, les résultats de conductivité monomoléculaire et de pH-stat suggèrent que la topologie transmembranaire donnant lieu aux activités de canal ionique soit favorisée en présence de gradients électrochimiques ou sous une différence de potentiel (90, 100, 101). Des études antérieures réalisées en spectroscopie IR-TF par réflexion totale atténuée (ATR) suggèrent d'ailleurs que le peptide 21-mère est en équilibre dynamique entre des orientations en surface et transmembranaire (91). Des comportements similaires ont été observés pour les peptides « voltage-gated sodium » S4 et l'alaméthicine où l'orientation membranaire est influencée par la présence d'une différence de potentiel ou d'un gradient de force ionique (340). De plus, des études réalisées par Duchohier et coll., et Juretic et coll. ont révélé que le peptide magainine affiche des activités de canal ionique bien que son orientation en surface soit la plus stable (373-375). En somme, il semble que le peptide 21-mère s'adsorbe à la surface des bicouches lipidiques, et que sous des conditions de gradients ioniques ou d'une différence de potentiel, son équilibre dynamique favorise une orientation transmembranaire donnant lieu aux activités de canal ionique précédemment observées. Le plus grand angle polaire du peptide 21-mère comparativement au peptide 14-mère suggère que le peptide 21-mère est localisé davantage en surface des bicouches. Une pénétration moins importante du peptide 21-mère dans la région interfaciale des bicouches lipidiques peut expliquer l'inactivité du peptide 21-mère à induire le relargage de sondes fluorescentes de vésicules lipidiques. Toutefois, en présence de cellules naturelles présentant des gradients ioniques et une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, il semble que le peptide 21-mère soit en mesure d'adopter une orientation transmembranaire transitoire permettant les déséquilibres ionique et électrique menant à la mort des cellules.

7.2 Perspectives futures des peptides antimicrobiens

Depuis la découverte des tous premiers peptides antimicrobiens d'origine naturelle et de leurs propriétés de perturbateurs membranaires, les études portant sur leurs paramètres structuraux et sur les mécanismes d'action qui en découlent n'ont cessé de croître. Devant l'accumulation d'information sur ces composés, plusieurs banques de données ont été formées dans le but de centraliser l'information et de la rendre facilement accessible aux chercheurs. Parmi ces banques de données accessibles via Internet, nous retrouvons les bases de données ANTIMIC contenant plus de 1700 séquences de peptides antimicrobiens (376), APD qui regroupe de l'information détaillée sur plus de 500 peptides antimicrobiens (377), SAPD qui recueille les données sur plus de 200 peptides antimicrobiens d'origine synthétique (378), et AMSDb qui est une banque plus générale dans laquelle plus de 800 structures de peptides d'origine animale et végétale y sont répertoriées (379).

Bien que l'engouement suscité par le potentiel des peptides antimicrobiens comme agents thérapeutiques soit justifié par les nombreux avantages que présentent ceux-ci sur les antibiotiques, nous devons toutefois demeurer prudents quant à leur utilisation à long terme. Malgré le fait que les peptides antimicrobiens soient reconnus pour induire peu de résistance, certaines bactéries telles que *S. aureus* (36) et *P. aeruginosa* (380) démontrent déjà des niveaux de tolérance envers certains peptides antimicrobiens d'origine humaine tels que les défensines. Parmi les mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens nouvellement observés et illustrés à la Figure 7.1, nous retrouvons la dégradation protéolytique, l'expulsion du peptide de l'intérieur de la bactérie via l'activation de transporteurs spécifiques et la diminution de la charge négative nette par l'introduction de molécules chargées positivement à la surface des membranes (381).

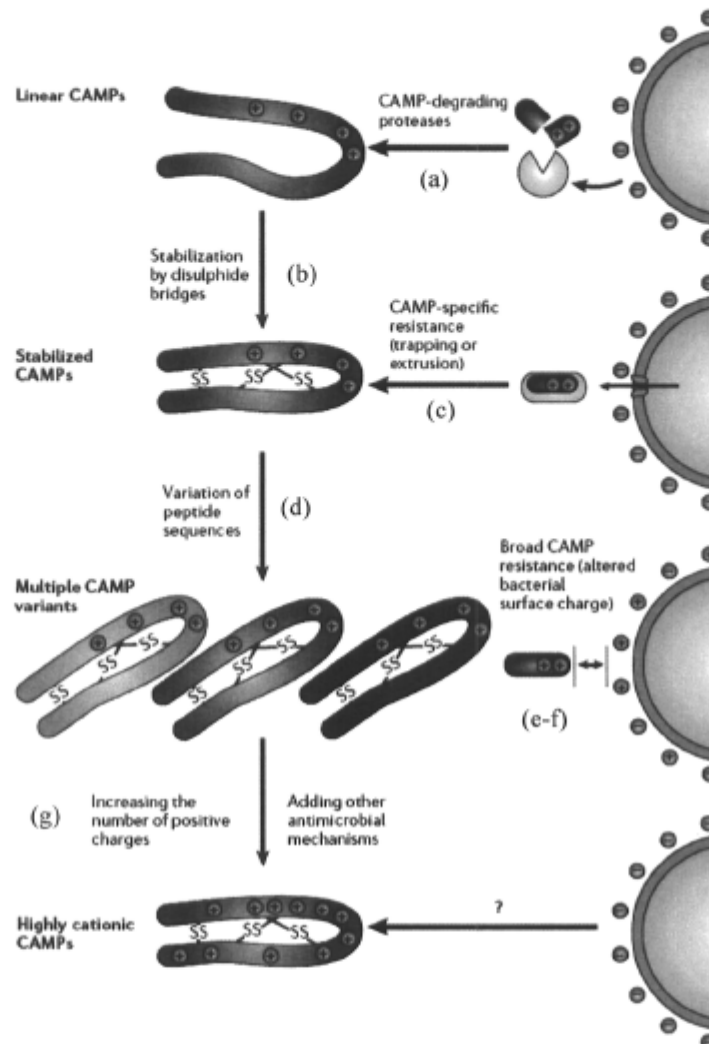


Figure 7.1: Schéma de l'évolution des propriétés des peptides antimicrobiens et de l'adaptation subséquente des mécanismes de résistance bactérienne: (a) Dégradation protéolytique des peptides linéaires, (b) Introduction de ponts disulfure limitant la dégradation protéolytique, (c) Transport du peptide hors de la bactérie via des transporteurs spécifiques, (d) Modification de la séquence en acides aminés et perte de reconnaissance par les transporteurs spécifiques, (e) Introduction de charges positives à la membrane bactérienne, (f) Répulsion électrostatique entre les peptides et la membrane, et (g) Augmentation du nombre de charges positives sur le peptide (381).

Tel qu'illustré à la Figure 7.1, il existe une évolution conjointe entre les propriétés des peptides antimicrobiens et la résistance bactérienne qui en découle. Nous sommes toutefois forcés de constater que les changements structuraux survenant chez les peptides antimicrobiens ne peuvent se faire sans fin et qu'ils sont sujets à certaines limitations permettant la conservation d'une activité antimicrobienne efficace. En prenant en considération ce que nous apprend l'étude des peptides antimicrobiens naturels et synthétiques, de leur évolution temporelle, et des paramètres structuraux essentiels aux activités biologiques désirées, il nous est plus facile d'orienter le design rationnel de ceux-ci. En ce sens, plusieurs groupes de recherche proposent diverses stratégies pour limiter ou retarder l'apparition des mécanismes de résistance bactérienne pour les peptides antimicrobiens. Une des stratégies proposées par les chercheurs repose sur les mécanismes de défense innés que les bactéries ont développés sur plusieurs milliers d'années pour contourner les défenses naturelles des mammifères telles que les enzymes bactériolytiques et les peptides antimicrobiens (défensines, cathélicidines, lactoferrines) (36). En bloquant diverses étapes du processus métabolique menant au développement des mécanismes de résistance bactérienne, les chercheurs espèrent ainsi rendre les bactéries plus vulnérables aux défenses naturelles des mammifères. À titre d'exemple, la bactérie Gram positive *S. aureus* a développé des moyens de résister aux peptides antimicrobiens par l'introduction de résidus D-alanine et L-lysine dans les structures respectives des acides téichoïques et des lipides phosphatidylglycérol pour en diminuer la charge nette négative (382, 383). Ce mécanisme de résistance bactérienne est également observé chez la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* par l'incorporation de résidus cationiques aminoarabinose dans la structure des lipides A constituant la couche de LPS (384). Ces modifications structurales exigent cependant la participation de nombreuses protéines tout au long du processus, et l'inactivation de ces protéines par de nouveaux agents antimicrobiens constitue une nouvelle avenue thérapeutique très prometteuse pour contrer les problèmes de résistance bactérienne (36). En effet, en bloquant sélectivement les mécanismes de résistance spécifiques aux bactéries, ces nouveaux agents antimicrobiens n'affecteraient pas les flores bactériennes saines du tractus intestinal et de la peau chez des mammifères. De plus, ces nouveaux agents antimicrobiens travailleraient de concert avec le système immunitaire des mammifères tout en le renforçant, au lieu de le remplacer dans ses fonctions de défense

(385). Enfin, la pression sélective exercée par ces nouveaux composés serait plus faible, compte tenu que les bactéries ne seraient pas détruites de façon agressive. Ainsi, les risques de développer une résistance en seraient diminués.

Une des alternatives également proposées par les scientifiques est d'orienter la recherche sur le développement d'agents antimicrobiens possédant des mécanismes d'action diversifiés et agissant simultanément sur plusieurs cibles (381). Contrairement aux antibiotiques qui, de manière générale, s'attaquent fortement à une seule cible et favorise par le fait même l'apparition de la résistance, la perturbation en parallèle de plusieurs fonctions biologiques de manière moins agressive semble être privilégiée. Il serait ainsi plus difficile pour la bactérie de développer une résistance puisque ce processus impliquerait la mutation quasi simultanée de plusieurs fonctions biologiques et le coût énergétique associé à ces changements structuraux et fonctionnels serait très important.

7.3- Orienter le design « antimicrobien » des peptides 14- et 21-mères

À la lumière des résultats présentés dans cette thèse, et de ceux obtenus des travaux antérieurs, nous sommes en mesure de proposer des modifications structurales pour les peptides 14- et 21-mères dans le but de leur conférer les propriétés biologiques désirées. Comme les peptides étudiés dans cette thèse sont de nature neutre, la première étape est de leur conférer un caractère cationique par l'introduction d'acides aminés chargés positivement tels que les résidus lysine et arginine. Des travaux sont actuellement en cours dans le laboratoire du professeur Normand Voyer sur la synthèse d'analogues cationiques du peptide 14-mère.

Comme il a été précisé à la section 1.4.1 portant sur les paramètres structuraux des peptides antimicrobiens, les caractères hélicoïdal et hydrophobe influencent grandement l'activité cytotoxique des peptides antimicrobiens. Comme les expériences *in vivo* ont révélé que le peptide 14-mère présente une activité hémolytique importante, nous

envisageons de remplacer des résidus leucine par des résidus proline ou glycine possédant une plus faible propension à former des structures hélicoïdales, et ainsi espérer diminuer l'activité hémolytique du peptide 14-mère par une perturbation de son caractère hélicoïdal. De plus, l'introduction de résidus moins hydrophobes tels que les résidus alanine et glycine pourraient également contribuer à diminuer l'activité hémolytique non désirée.

Un autre aspect structural intéressant des peptides 14- et 21-mères est la présence de résidus phénylalanine modifiés par la présence d'éthers en couronne. Sous une structure hélicoïdale, les éthers en couronne confèrent aux peptides un caractère amphiphile, et la région occupée par ceux-ci décrit un angle dans l'espace appelé angle polaire. En modifiant la taille et la position de ces éthers en couronne dans la séquence d'acides aminés, il serait donc possible de moduler à la fois le caractère amphiphile et l'angle polaire des peptides. Tel que mentionné à la section 1.4.1, une augmentation du moment hydrophobe chez les peptides résulte généralement en une perte de sélectivité, alors qu'un angle polaire inférieur à 120° augmente l'efficacité de perméabilisation tout en accentuant la sélectivité.

Un point qu'il sera important de considérer dans les études ultérieures des interactions lipides / peptides concerne les interactions peptides / peptides. En effet, il est reconnu que les perturbations membranaires induites par certains peptides antimicrobiens tels que l'alaméthicine, la mélittine, la magainine et la protégrine sont fonction de leur concentration et que cette dépendance est non linéaire. Ce phénomène s'appelle la coopérativité et s'explique par le fait qu'en deça d'une certaine concentration, les peptides interagissent très faiblement entre eux, et s'adsorbent à la surface des membranes (49, 54). Cette adsorption peut créer les pores transitoires très instables. Cet état se dénote S. Toutefois, au fur et à mesure que la concentration augmente et atteint une concentration critique notée P/L^* (rapport molaire peptides / lipides), les peptides commencent à interagir et à former des pores membranaires. Au-delà de la concentration critique P/L^* , les peptides forment des pores membranaires stables et il y a recrutement d'autres unités peptidiques qui adoptent également l'état transmembranaire dénoté I. L'étude des interactions peptides / peptides ouvrira ainsi la voie à une compréhension plus complète des mécanismes de

perturbation membranaire des peptides antimicrobiens puisque selon les modèles « barrel-stave » et « toroïdal », il semble y avoir des interactions peptides / peptides donnant lieu à la formation des pores.

Bien qu'il reste encore beaucoup de travail à effectuer dans le développement et dans la compréhension des mécanismes d'action des peptides 14- et 21-mères pour en faire de nouveaux agents antimicrobiens et cytotoxiques, nous croyons que les études antérieures et actuelles ont révélé leur potentiel thérapeutique comme perturbateurs membranaires. Ce travail s'inscrit dans un long processus pluridisciplinaire où des chercheurs des disciplines de la synthèse organique sur support solide, de la microbiologie moléculaire, de la biophysique moléculaire et de la bio-informatique mettent en commun leur expertise à la réalisation d'un projet de grande envergure. Plus spécifiquement, cette approche vise la synthèse rapide en parallèle de nombreux analogues cationiques en vue des tests sur une gamme variée d'agents pathogènes tels que les bactéries Gram positive et négative, les levures, les champignons, les cellules cancéreuses, les érythrocytes, etc. Des études biophysiques seront réalisées par spectroscopies de RMN, infrarouge, ATR, de fluorescence, ainsi que par la spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire. Ces techniques fourniront de l'information sur les perturbations induites aux bicouches lipidiques, de même que sur la topologie membranaire et la structure de ces composés (mesure de distances internucléaires et d'angles de torsion). Ces tests seront supportés par des études bio-informatiques complémentaires dont les renseignements obtenus permettent d'approfondir les connaissances sur la nature des interactions entre peptides et membranes lipidiques.

Bibliographie

1. Beovic, B. (2006) The issue of antimicrobial resistance in human medicine, *Int. J. Food Microbiol.* **112**, 280-287.
2. Krasovec, R., et Jerman, I. (2003) Bacterial multicellularity as a possible source of antibiotic resistance, *Med. Hypotheses* **60**, 484-488.
3. Guillemot, D. (1999) Antibiotic use in humans and bacterial resistance, *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 494-498.
4. Foucault, C., et Brouqui, P. (2007) How to fight antimicrobial resistance, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49**, 173-183.
5. World Health Organization, (2004) WHO Report on monitoring Antimicrobial Resistance, New Delhi, India.
<http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section17/Section58/Section1666.htm>
6. Organisation Mondiale de la Santé (2005) Rapport du Secrétariat. La résistance aux antibiotiques: une menace pour la sécurité sanitaire mondiale.
http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/A58_14-fr.pdf
7. Nicolle, L. E. (2001) WHO Report on Infection control programmes to contain antimicrobial resistance.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.7.pdf
8. Schmidt, F. R. (2004) The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 335-343.
9. Hancock, R. E. W., et Sahl, H.-G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nature Biotechnol.* **24**, 1551-1557.
10. Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* **415**, 389-395.
11. Bals, R., et Wilson, J. M. (2003) Cathelicidins- a family of multifunctional antimicrobial peptides, *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 711-720.
12. Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., et Oppenheim, J. J. (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal, *Trends Immunol.* **23**, 291-296.
13. Brown, K. L., et Hancock, R. E. W. (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides, *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 24-30.
14. Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., et Hancock, R. E. W. (2005) A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity, *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 35-51.
15. Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., et Aranha, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises, *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**, 536-547.
16. Hancock, R. E. W., et Chapple, D. S. (1999) Peptide antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317-1323.
17. Hancock, R. E. W. (1999) Host defence (cationic) peptides, *Drugs* **57**, 469-473.
18. Jenssen, H., Hamill, P., et Hancock, R. E. W. (2006) Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491-511.
19. Hancock, R. E. W., et Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics, *Trends Biotechnol.* **16**, 82-88.

20. Powers, J.-P. S., et Hancock, R. E. W. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides* **24**, 1681-1691.
21. Piers, K. L., Brown, M. H., et Hancock, R. E. W. (1993) Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria, *Gene* **134**, 7-13.
22. Piers, K. L., et Hancock, R. E. W. (1994) The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* **12**, 951-958.
23. Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nature* **3**, 238-250.
24. Hwang, P. M., et Vogel, H. J. (1998) Structure-function relationships of antimicrobial peptides, *Biochem. Cell Biol.* **76**, 235-246.
25. Epand, R. M., et Vogel, H. J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 11-28.
26. Hancock, R. E. W., et Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.
27. Hancock, R. E. W., et Scott, M. G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8856-8861.
28. Fehri, L. F., Wroblewski, H., et Blanchard, A. (2007) Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 468-474.
29. Shai, Y. (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides, *Biopolymers* **66**, 236-248.
30. Mor, A., Nguyen, V. H., Delfour, A., Migliore-Samour, D., et Nicolas, P. (1991) Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin, *Biochemistry* **30**, 8824-8830.
31. Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5449-5453.
32. Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., et Boman, H. G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity, *Nature* **292**, 246-248.
33. Papo, N., et Shai, Y. (2005) A molecular mechanism for lipopolysaccharide protection of gram-negative bacteria from antimicrobial peptides, *J. Biol. Chem.* **280**, 10378-10387.
34. <http://microbiologie.spectrosciences.com>.
35. Prescott, L., Harley, J. P., et Klein, D. A. (1995) *Microbiologie*, De Boeck Université, Bruxelles, 1014 p.
36. Weidenmaier, C., Kristian, S. A., et Peschel, A. (2003) Bacterial resistance to antimicrobial host defenses. An emerging target for novel anti-infective strategies?, *Curr. Drug Targets* **4**, 643-649.
37. Cudic, M., et Otvos, L. J. (2002) Intracellular targets of antibacterial peptides, *Curr. Drug Targets* **3**, 101-106.

38. Xiong, Y.-Q., Yeaman, M. R., et Bayer, A. S. (1999) In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action, *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1111-1117.
39. Sato, H., et Feix, J. B. (2006) Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1245-1256.
40. Matsuzaki, K., Sugishita, K.-i., et Miyajima, K. (1999) Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria, *FEBS Lett.* **449**, 221-224.
41. Park, S.-C., Kim, J.-Y., Shin, S.-O., Jeong, C.-Y., Kim, M.-H., Shin, S. Y., Cheong, G.-W., Park, Y., et Hahm, K.-S. (2006) Investigation of toroidal pore and oligomerization by melittin using transmission electron microscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 222-228.
42. Xiong, Y. Q., Mukhopadhyay, K., Yeaman, M. R., Adler-Moore, J., et Bayer, A. S. (2005) Functional interrelationship between cell membrane and cell wall in antimicrobial peptide-mediated killing of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3114-3121.
43. Hancock, R. E. W. (1997) Peptide antibiotics, *Lancet* **349**, 418-422.
44. Bessale, R., Kapitkovsky, A., Gorea, A., Shalit, I., et Fridkin, M. (1990) All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance, *FEBS Lett.* **274**, 151-155.
45. Oren, Z., et Shai, Y. (1997) Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study, *Biochemistry* **36**, 1826-1835.
46. Saberwal, G., et Nagaraj, R. (1994) Cell-lytic antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities, *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 109-131.
47. Asthana, N., Yadav, S. P., et Ghosh, J. K. (2004) Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin, *J. Biol. Chem.* **279**, 55042-55050.
48. Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L., et Deber, C. M. (2005) Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes, *J. Biol. Chem.* **280**, 33960-33967.
49. Huang, H. W. (2006) Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1292-1302.
50. Lee, M.-T., Hung, W.-C., Chen, F.-Y., et Huang, H. W. (2005) Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation, *Biophys. J.* **89**, 4006-4016.
51. Matsuzaki, K., Sugishita, K.-i., Fujii, N., et Miyajima, K. (1995) Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, Magainin 2, *Biochemistry* **34**, 3423-3429.
52. Matsuzaki, K., Sugishita, K.-i., Harada, M., Fujii, N., et Miyajima, K. (1997) Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* **1327**, 119-130.
53. Seelig, J. (2004) Thermodynamics of lipid-peptide interactions, *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 40-50.

54. Huang, H. W. (2000) Action of antimicrobial peptides: two-state model, *Biochemistry* **39**, 8347-8352.
55. Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 1-10.
56. Yeaman, M. R., et Yount, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.* **55**, 27-55.
57. Bechinger, B. (1999) The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 157-183.
58. Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G., et Shai, Y. (1995) Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles, *Biochemistry* **34**, 11479-11488.
59. Gazit, E., Lee, W.-J., Brey, P. T., et Shai, Y. (1994) Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study, *Biochemistry* **33**, 10681-10692.
60. Gazit, E., Miller, I. R., Biggin, P. C., Sansom, M. S. P., et Shai, Y. (1996) Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes, *J. Mol. Biol.* **258**, 860-870.
61. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., et Shai, Y. (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes, *Biochemistry* **31**, 12416-12423.
62. Yamaguchi, S., Huster, D., Waring, A., Lehrer, R. I., Kearney, W., Tack, B. F., et Hong, M. (2001) Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* **81**, 2203-2214.
63. Dufourcq, J., Faucon, J.-F., Fourche, G., Dasseux, J.-L., Le Maire, M., et Gulik-Krzywicki, T. (1986) Morphological changes of phosphatidylcholine bilayers induced by melittin: vesicularization, fusion, discoidal particles, *Biochim. Biophys. Acta* **859**, 33-48.
64. Ladokhin, A. S., et White, S. H. (2001) "Detergent-like" permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin, *Biochim. Biophys. Acta* **1514**, 253-260.
65. Bechinger, B. (2004) Structure and function of membrane-lytic peptides, *Crit. Rev. Plant. Sci.* **23**, 271-292.
66. Killian, J. A. (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 401-416.
67. Oren, Z., et Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* **47**, 451-463.
68. He, K., Ludtke, S. J., et Huang, H. W. (1995) Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering, *Biochemistry* **34**, 15614-15618.
69. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., et Miyajima, K. (1995) Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore, *Biochemistry* **34**, 6521-6526.
70. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., et Miyajima, K. (1996) An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation, *Biochemistry* **35**, 11361-11368.

71. Matsuzaki, K. (1998) Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 391-400.
72. Murzyn, K., et Pasenkiewicz-Gierula, M. (2003) Construction of a toroidal model for the magainin pore, *J. Mol. Mod.* **9**, 217-224.
73. Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., et Huang, H. W. (1996) Membrane pores induced by magainin, *Biochemistry* **35**, 13723-13728.
74. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., et Huang, H. W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys. J.* **81**, 1475-1485.
75. Chen, Y., Mant, C. T., Farmers, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., et Hodges, R. S. (2005) Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index, *J. Biol. Chem.* **280**, 12316-12329.
76. Dathe, M., et Wieprecht, T. (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 71-87.
77. Toke, O. (2005) Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections, *Biopolymers* **80**, 717-735.
78. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., et Bienert, M. (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett.* **501**, 146-150.
79. Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K.-i., Fujii, N., et Miyajima, K. (1997) Modulation of magainin 2 - lipid bilayer interactions by peptide charge, *Biochemistry* **36**, 2104-2111.
80. Unger, T., Oren, Z., et Shai, Y. (2001) The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interactions: implication to their mode of action, *Biochemistry* **40**, 6388-6397.
81. Shai, Y., et Oren, Z. (1996) Diastereomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides, *J. Biol. Chem.* **271**, 7305-7308.
82. Kustanovich, I., D.E., S., Mikhlin, M., Gaidukov, L., et Mor, A. (2002) Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives, *J. Biol. Chem.* **277**, 16941-16951.
83. Maloy, W. L., et Prasad Kari, U. (1995) Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides, *Biopolymers* **37**, 105-122.
84. Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, L., MacDonald, D., et Bienert, M. (1997) Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes, *Biochemistry* **36**, 6124-6132.
85. Dathe, M., Meyer, J., Beyermann, M., Maul, B., Hoischen, C., et Bienert, M. (2002) General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides, *Biochim. Biophys. Acta* **1558**, 171-186.
86. Subbalakshmi, C., et Sitaram, N. N. (1999) Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity, *FEBS Lett.* **448**, 62-66.

87. Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., Beyermann, M., et Bienert, M. (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides, *FEBS Lett.* **403**, 208-212.
88. Wieprecht, T., Dathe, M., Epanand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., et Bienert, M. (1997) Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides, *Biochemistry* **36**, 12869-12880.
89. Uematsu, N., et Matsuzaki, K. (2000) Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: a model peptide study, *Biophys. J.* **79**, 2075-2083.
90. Biron, E., Otis, F., Meillon, J.-C., Robitaille, M., Lamothe, J., Van Hove, P., Cormier, M.-E., et Voyer, N. (2004) Design, synthesis, and characterization of peptide nanostructures having ion channel activity, *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 1279-1290.
91. Biron, E., Voyer, N., Meillon, J.-C., Cormier, M.-E., et Auger, M. (2000) Conformational and orientation studies of artificial ion channels incorporated into lipid bilayers, *Biopolymers* **55**, 364-372.
92. Biron, E. (1999) Mémoire de maîtrise, *Département de chimie*, Université Laval, 214 p.
93. Biron, E. (2002) Thèse de doctorat, *Département de chimie*, Université Laval, 339 p.
94. Branden, C., et Tooze, J. (1999) *Introduction to Protein Structure*, Garland, New York, 410 p.
95. Gokel, G. (1991) *Crown Ethers and Cryptands*, Black Bear Press Ltd, Cambridge, 190 p.
96. Gokel, G., Leevy, W. M., et Weber, M. E. (2004) Crown ethers: sensors for ions and molecular scaffolds for materials and biological models, *Chem. Rev.* **104**, 2723-2750.
97. Vandenburg, Y. R., Smith, B. D., Biron, E., et Voyer, N. (2002) Membrane disruption ability of facially amphiphilic helical peptides, *Chem. Commun.* **16**, 1694-1695.
98. Otis, F. (2003) Mémoire de maîtrise, *Département de chimie*, Université Laval, 127 p.
99. Meillon, J.-C. (1998) Thèse de doctorat, *Département de chimie*, Université de Sherbrooke, 334 p.
100. Meillon, J.-C., et Voyer, N. (1997) A synthetic transmembrane channel active in lipid bilayers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**, 967-969.
101. Voyer, N., et Robitaille, M. (1995) A novel functional artificial ion channel, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6599-6600.
102. Blondelle, S. E., et Houghten, R. A. (1991) Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin, *Biochemistry* **30**, 4671-4678.
103. Hauser, H., et Poupart, G. (2005) in *The Structure of Biological Membranes* (Yeagle, P. L., Ed.), CRC Press LLC, Boca Raton, pp.1-51.
104. Tien, H. T., et Ottova-Leitmannova, A. (2000) *Membrane Biophysics as viewed from experimental bilayer lipid membranes*, Elsevier Science, Amsterdam, 640 p.

105. Schechter, E. (1990) *Biochimie et Biophysique des Membranes: Aspects Structuraux et Fonctionnels*, Masson, Paris, 414 p.
106. Rand, R. P., et Parsegian, V. A. (2005) in *The Structure of Biological Membranes* (Yeagle, P. L., Ed.), CRC Press LLC, Boca Raton, pp.201-241.
107. Campbell, N. A. (1995) *Biologie*, ERPI, Saint-Laurent, 1190 p.
108. Singer, S. J., et Nicolson, G. L. (1952) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* **175**, 720-731.
109. Villalain, J. (1996) Location of cholesterol in model membranes by magic-angle-sample-spinning, *Eur. J. Biochem.* **241**, 586-593.
110. Yeagle, P. L. (1985) Cholesterol and the cell membrane, *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 267-287.
111. Yeagle, P. L. (1988) *Biology of cholesterol*, CRC Press, Floride, 242 p.
112. Maret, G., et Dransfeld, K. (1985) in *Topics in Applied Physics. Strong and Ultrastrong Magnetic Fields and Their Applications* (Herlach, F., Ed.), Springer Verlag, New York, pp.143-204.
113. Qiu, X., Mirau, P. A., et Pidgeon, C. (1993) Magnetically induced orientation of phosphatidylcholine membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **1147**, 59-72.
114. Seelig, J., Borle, F., et Cross, T. A. (1985) Magnetic ordering of phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **814**, 195-198.
115. Speyer, J. B., Sripada, P. K., Das Gupta, S. K., Shipley, G. G., et Griffin, R. G. (1987) Magnetic orientation of sphingomyelin-lecithin bilayers, *Biophys. J.* **51**, 687-691.
116. Brumm, T., Mops, A., Dolainsky, C., Bruckner, S., et Bayerl, T. M. (1992) Macroscopic orientation effects in broadline NMR-spectra of model membranes at high magnetic field strength, *Biophys. J.* **61**, 1018-1024.
117. Neugebauer, D.-C., et Blaurock, A. E. (1977) Magnetic orientation of purple membranes demonstrated by optical measurements and neutron scattering, *FEBS Lett.* **78**, 31-35.
118. Worcester, D. L. (1978) Structural origins of diamagnetic anisotropy in proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5475-5477.
119. Cullis, P. R., et de Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 399-420.
120. Lewis, R. N. A. H., et McElhaney, R. N. (2005) in *The Structure of Biological Membranes* (Yeagle, P. L., Ed.), CRC Press LLC, Boca Raton, pp.53-120.
121. McIntosh, T. J., et Magid, A. D. (1993) in *Phospholipids Handbook* (Cevc, G., Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp.553-577.
122. Rand, R. P., et Parsegian, V. A. (1989) Hydration forces between phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* **988**, 351-376.
123. Hauser, H. (1993) in *Phospholipids Handbook* (Cevc, G., Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp.603-637.
124. Gawrisch, K. (2005) in *The Structure of Biological Membranes* (Yeagle, P. L., Ed.), CRC Press LLC, Boca Raton, pp.147-171.
125. Papo, N., et Shai, Y. (2003) Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?, *Peptides* **24**, 1693-1703.

126. Crommelin, D. J. A., Talsma, H., Grit, M., et Zuidam, N. J. (1993) in *Phospholipids Handbook* (Cevc, G., Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp.335-348.
127. Zuidam, N. J., van Winden, E., de Vruhe, R., et Crommelin, D. J. A. (2003) in *Liposomes* (Press, O. U., Ed.), Torchilin, V. et Weissig, V., Oxford, pp.149-165.
128. Cross, T. A., et Opella, S. J. (1994) Solid-state NMR structural studies of peptides and proteins in membranes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 574-581.
129. Franzin, C. M., et Marassi, F. M. (2006) NMR structure determination of proteins in bilayer lipid membranes: the FXYD family proteins, *Adv. Planar Lipid Bilayers and Liposomes* **2**, 78-93.
130. Bechinger, B., Kinder, R., Helmle, M., Vogt, T. C. B., Harzer, U., et Schinzel, S. (1999) Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy, *Biopolymers* **51**, 174-190.
131. Bechinger, B., et Sizun, C. (2003) Alignment and structural analysis of membrane polypeptides by ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy, *Concepts Magn. Reson.* **18A**, 130-145.
132. Cross, T. A., et Quine, J. R. (2000) Protein structure in anisotropic environments: development of orientational constraints, *Concepts Magn. Reson.* **12**, 55-70.
133. Fu, R., et Cross, T. A. (1999) Solid-state nuclear magnetic resonance investigation of protein and polypeptide structure, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 235-268.
134. Marcotte, I., et Auger, M. (2005) Bicelles as model membranes for solid-state and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins, *Concepts Magn. Reson.* **24A**, 17-37.
135. Sanders, C. R., et Prosser, R. S. (1998) Bicelles: a model membrane system for all seasons?, *Structure* **15**, 1227-1234.
136. Sanders, C. R., et Schwonek, J. P. (1992) Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR, *Biochemistry* **31**, 8898-8905.
137. Sanders, C. R., et Landis, G. C. (1995) Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies, *Biochemistry* **34**, 4030-4040.
138. Vold, R. R., et Prosser, R. S. (1996) Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist?, *J. Magn. Reson.* **113**, 267-271.
139. Gabriel, N. E., et Roberts, M. F. (1984) Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles, *Biochemistry* **23**, 4011-4015.
140. Gabriel, N. E., et Roberts, M. F. (1986) Interaction of short-chain lecithin with long-chain phospholipids: characterization of vesicles that form spontaneously, *Biochemistry* **25**, 2812-2821.
141. Ram, P., et Prestegard, J. H. (1988) Magnetic field induced ordering of bile salt / phospholipid micelles: new media for NMR structural investigations, *Biochim. Biophys. Acta* **940**, 289-294.
142. Sanders, C. R., et Prestegard, J. H. (1990) Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO, *Biophys. J.* **58**, 447-460.

143. Luchette, P. A., Vetman, T. N., Prosser, R. S., Hancock, R. E. W., Nieh, M.-P., Glinka, C. J., Krueger, S., et Katsaras, J. (2001) Morphology of fast-tumbling bicelles: a small angle neutron scattering and NMR study, *Biochim. Biophys. Acta* **1513**, 83-94.
144. Vold, R., Prosser, R. S., et Deese, A. J. (1997) Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides, *J. Biomol. NMR* **9**, 329-335.
145. Prosser, R. S., Evanics, F., Kitevski, J. L., et Al-Abdul-Wahid, M. S. (2006) Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins, *Biochemistry* **45**, 8453-8465.
146. Andersson, A., et Mäler, L. (2006) Size and shape of fast-tumbling bicelles as determined by translational diffusion, *Langmuir* **22**, 2447-2449.
147. Sanders, C. R., et Landis, G. C. (1994) Facile acquisition and assignment of oriented sample NMR spectra for bilayer surface-associated proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6470-6471.
148. Andersson, A., et Mäler, L. (2002) NMR solution structure and dynamics of motilin in isotropic phospholipid bicellar solution, *J. Biomol. NMR* **24**, 103-112.
149. Marcotte, I., Separovic, F., Auger, M., et Gagné, S. M. (2004) A multidimensional ¹H NMR investigation of the conformation of methionine-enkephalin in fast-tumbling bicelles, *Biophys. J.* **86**, 1587-1600.
150. Arnold, A., Labrot, T., Oda, R., et Dufourc, E. J. (2002) Cation modulation of bicelle size and magnetic alignment as revealed by solid-state NMR and electron microscopy, *Biophys. J.* **83**, 2667-2680.
151. Raffard, G., Steinbruckner, S., Arnold, A., Davis, J. H., et Dufourc, E. J. (2000) Temperature-composition diagram of dimyristoylphosphatidylcholine-dicaproylphosphatidylcholine "bicelles" self-orienting in the magnetic field. A solid state ²H and ³¹P NMR study, *Langmuir* **16**, 7655-7662.
152. Sanders, C. R., Hare, B. J., Howard, K. P., et Prestegard, J. H. (1994) Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **26**, 421-444.
153. Sternin, E., Nizza, D., et Gawrisch, K. (2001) Temperature dependence of DMPC/DHPC mixing in a bicellar solution and its structural implications, *Langmuir* **17**, 2610-2616.
154. Crowell, K. J., et Macdonald, P. M. (1999) Surface charge response of the phosphatidylcholine head group in bilayered micelles from phosphorus and deuterium nuclear magnetic resonance, *Biochim. Biophys. Acta* **1416**, 21-30.
155. Lu, J.-X., Caporini, M. A., et Lorigan, G. A. (2004) The effects of cholesterol on magnetically aligned phospholipid bilayers: a solid-state NMR and EPR spectroscopy study, *J. Magn. Reson.* **168**, 18-30.
156. Marcotte, I., Dufourc, E. J., Ouellet, M., et Auger, M. (2003) Interaction of the neuropeptide met-enkephalin with zwitterionic and negatively charged bicelles as viewed by ³¹P and ²H solid-state NMR, *Biophys. J.* **85**, 328-339.
157. Parker, M. A., King, V., et Howard, K. P. (2001) Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* **1514**, 206-216.

158. Struppe, J., Whiles, J. A., et Vold, R. R. (2000) Acidic phospholipid bicelles: a versatile model membrane system, *Biophys. J.* **78**, 281-289.
159. Triba, M. N., Devaux, P. F., et Warschawski, D. E. (2006) Effects of lipid chain length and unsaturation on bicelles stability. A phosphorus NMR study, *Biophys. J.* **91**, 1357-1367.
160. Whiles, J. A., Glover, K. J., Vold, R. R., et Komives, E. A. (2002) Methods for studying transmembrane peptides in bicelles: consequences of hydrophobic mismatch and peptide sequence, *J. Magn. Reson.* **158**, 149-156.
161. Aussenac, F., Lavigne, B., et Dufourc, E. J. (2005) Toward bicelle stability with ether-linked phospholipids: temperature, composition, and hydration diagrams by ^2H and ^{31}P solid-state NMR, *Langmuir* **21**, 7129-7135.
162. Ottiger, M., et Bax, A. (1999) Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values, *J. Biomol. NMR* **13**, 187-191.
163. Dave, P. C., Billington, E., Pan, Y.-L., et Straus, S. K. (2005) Interaction of alamethicin with ether-linked phospholipid bilayers: oriented circular dichroism, ^{31}P solid-state NMR, and differential scanning calorimetry studies, *Biophys. J.* **89**, 2434-2442.
164. Prosser, R. S., Hunt, S. A., DiNatale, J. A., et Vold, R. R. (1996) Magnetically aligned membrane model systems with positive order parameter: switching the sign of S_{zz} with paramagnetic ions, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 269-270.
165. Prosser, R. S., Hwang, J. S., et Vold, R. R. (1998) Magnetically aligned phospholipid bilayers with positive ordering: a new model membrane system, *Biophys. J.* **74**, 2405-2418.
166. Prosser, R. S., et Shiyankovskaya, I. V. (2001) Lanthanide ion assisted magnetic alignment of model membranes and macromolecules, *Concepts Magn. Reson.* **13**, 19-31.
167. Prosser, R. S., Volkov, V. B., et Shiyankovskaya, I. V. (1998) Solid-state NMR studies of magnetically aligned phospholipid membranes: taming lanthanides for membrane protein studies, *Biochem. Cell Biol.* **76**, 443-451.
168. Prosser, R. S., Volkov, V. B., et Shiyankovskaya, I. V. (1998) Novel chelate-induced magnetic alignment of biological membranes, *Biophys. J.* **75**, 2163-2169.
169. Prosser, R. S., Bryant, H., Bryant, R. G., et Vold, R. R. (1999) Lanthanide chelates as bilayer alignment tools in NMR studies of membrane-associated peptides, *J. Magn. Reson.* **141**, 256-260.
170. De Angelis, A. A., Howell, S. C., Nevzorov, A. A., et Opella, S. J. (2006) Structure determination of a membrane protein with two trans-membrane helices in aligned phospholipid bicelles by solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12256-12267.
171. De Angelis, A. A., Nevzorov, A. A., Park, S. H., Howell, S. C., Mrse, A. A., et Opella, S. J. (2004) High-resolution NMR spectroscopy of membrane proteins in aligned bicelles, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15340-15341.
172. Howard, K. P., et Opella, S. J. (1996) High-resolution solid-state NMR spectra of integral membrane proteins reconstituted into magnetically oriented phospholipid bilayers, *J. Magn. Reson.* **112**, 91-94.

173. Marcotte, I., Bélanger, A., et Auger, M. (2006) The orientation effect of gramicidin A on bicelles and Eu^{3+} -doped bicelles as studied by solid-state NMR and FT-IR spectroscopy, *Chem. Phys. Lipids* **139**, 137-149.
174. Triba, M. N., Zoonens, M., Popot, J.-L., Devaux, P. F., et Warschawski, D. E. (2006) Reconstitution and alignment by a magnetic field of a β -barrel membrane protein in bicelles, *Eur. Biophys. J.* **35**, 268-275.
175. Nieh, M.-P., Glinka, C. J., et Krueger, S. (2001) SANS study of the structural phases of magnetically alignable lanthanide-doped phospholipid mixtures, *Langmuir* **17**, 2629-2638.
176. Nieh, M.-P., Glinka, C. J., Krueger, S., Prosser, R. S., et Katsaras, J. (2002) SANS study of the effect of lanthanide ions and charged lipids on the morphology of phospholipid mixtures, *Biophys. J.* **82**, 2487-2498.
177. Nieh, M.-P., Raghunathan, V. A., Wang, H., et Katsaras, J. (2003) Highly aligned lamellar lipid domains induced by macroscopic confinement, *Langmuir* **19**, 6936-6941.
178. Wang, H., Nieh, M. P., Hobbie, E. K., Glinka, C. J., et Katsaras, J. (2003) Kinetic pathway of the bilayered-micelle to perforated-lamellae transition, *Phys. Rev.* **67**, 1-4.
179. Rowe, B. A., et Neal, S. L. (2003) Fluorescence probe study of bicelle structure as a function of temperature: developing a practical bicelle structure model, *Langmuir* **19**, 2039-2048.
180. Nieh, M. P., Raghunathan, V. A., Glinka, C. J., Harroun, T. A., Pabst, G., et Katsaras, J. (2004) Magnetically alignable phase of phospholipid "bicelle" mixtures is a chiral nematic made up of wormlike micelles, *Langmuir* **20**, 7893-7897.
181. Nieh, M.-P., Raghunathan, V. A., Glinka, C. J., Harroun, T., et Katsaras, J. (2005) Structural phase behavior of high-concentration alignable biomimetic bicelle mixtures, *Macromol. Symp.* **219**, 135-145.
182. Triba, M. N., Warschawski, D. E., et Devaux, P. F. (2005) Reinvestigation by phosphorus NMR of lipid distribution in bicelles, *Biophys. J.* **88**, 1887-1901.
183. Czerski, L., et Sanders, C. R. (2000) Functionality of a membrane protein in bicelles, *Anal. Biochem.* **284**, 327-333.
184. Whiles, J. A., Deems, R., Vold, R. R., et Dennis, E. A. (2002) Bicelles in structure-function studies of membrane-associated proteins, *Bioorg. Chem.* **30**, 431-442.
185. Pfeifer, H. (1999) A short history of nuclear magnetic resonance spectroscopy and of its early years in Germany, *Magn. Reson. Chem.* **37**, S154-S159.
186. Emsley, J. W., et Feeney, J. (1995) Milestones in the first fifty years of NMR, *Prog. NMR Spectrosc.* **28**, 1-9.
187. Bloch, F., Hansen, W. W., et Packard, M. E. (1946) Nuclear induction, *Phys. Rev.* **69**, 127.
188. Purcell, E. M., Torrey, H. C., et Pound, R. V. (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid, *Phys. Rev.* **69**, 37-38.
189. King, R. W., et Williams, K. R. (1989) The Fourier transform in chemistry: nuclear magnetic resonance: introduction, *J. Chem. Educ.* **66**, A213-A219.
190. Levitt, M. H. (2001) *Spin Dynamics. Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley and Sons Inc., West Sussex, 686 p.

191. Schmidt-Rohr, K., et Wolfgang Spiess, H. (1994) *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press Inc., San Diego, 478 p.
192. Williams, K. R., et King, R. W. (1990) The Fourier transform in chemistry: NMR multiple-pulse experiments, *J. Chem. Educ.*, A93-A99.
193. Jelinski, L. W., et Melchior, M. T. (2000) High-resolution NMR of solids, *Appl. Spectrosc. Rev.* **35**, 25-93.
194. Ashbrook, S. E., et Duer, M. J. (2006) Structural information from quadrupolar nuclei in solid state NMR, *Concepts Magn. Reson.* **28A**, 183-248.
195. Davis, J. H., Jeffrey, K. R., Bloom, M., Valic, M. I., et Higgs, T. P. (1976) Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains, *Chem. Phys. Lett.* **42**, 390-394.
196. Iuga, A., Ader, C., Gröger, C., et Brunner, E. (2007) Applications of solid-state ^{31}P NMR spectroscopy, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **60**, 145-189.
197. Smith, I. C. P., et Ekiel, I. H. (1984) in *Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications* (Gorenstein, D. G., Ed.), Academic Press, London, pp.447-475.
198. Seelig, J. (1978) ^{31}P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 105-140.
199. Picard, F., Paquet, M.-J., Lévesque, J., Bélanger, A., et Auger, M. (1999) ^{31}P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes, *Biophys. J.* **77**, 888-902.
200. Picard, F., Pézolet, M., Bougis, P. E., et Auger, M. (2000) Hydrophobic and electrostatic cardiotoxin-phospholipid interactions as seen by solid-state ^{31}P NMR spectroscopy, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* **45**, 72-83.
201. Hahn, E. L. (1950) Spin echoes, *Phys. Rev.* **80**, 580-594.
202. Strandberg, E., et Ulrich, A. S. (2004) NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides, *Concepts Magn. Reson.* **23A**, 89-120.
203. Davis, J. H. (1983) The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ^2H -NMR, *Biochim. Biophys. Acta* **737**, 117-171.
204. Auger, M. (1990) Thèse de doctorat, *Département de chimie*, Université d'Ottawa, 280 p.
205. Seelig, J., Seelig, A., et Tamm, L. (1982) in *Lipid-Protein Interactions* (P.C. Jost et O.H. Griffith, Eds), John Wiley and Sons, New York, pp.127-148.
206. Fukushima, E., et Roeder, S. B. W. (1981) *Experimental pulse NMR. A Nuts and Bolts Approach.*, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, 539 p.
207. Smith, S. O., et Peersen, O. B. (1992) Solid-state NMR approaches for studying membrane protein structure, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **21**, 25-47.
208. Bechinger, B., et Opella, S. J. (1991) Flat-coil probe for NMR spectroscopy of oriented membrane samples, *J. Magn. Reson.* **95**, 585-588.
209. Wu, C. H., Ramamoorthy, A., Gierasch, M., et Opella, S. J. (1995) Simultaneous characterization of the amide ^1H chemical shift, ^1H - ^{15}N dipolar, and ^{15}N chemical shift interaction tensors in a peptide bond by three-dimensional solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6148-6149.
210. Aisenbrey, C., et Bechinger, B. (2004) Investigations of polypeptide rotational diffusion in aligned membranes by ^2H and ^{15}N solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16676-16683.

211. Bechinger, B. (2000) Biophysical investigations of membrane perturbations by polypeptides using solid-state NMR spectroscopy, *Mol. Membr. Biol.* **17**, 135-142.
212. Nevzorov, A. A., De Angelis, A. A., Park, S. H., et Opella, S. J. (2006) in *NMR Spectroscopy of Biological Solids* (Ramamoorthy, A., Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp.178-190.
213. Hartmann, S. R., et Hahn, E. L. (1962) Nuclear double resonance in the rotating frame, *Phys. Rev.* **128**, 2042-2053.
214. Hughes, C. E., et Baldus, M. (2005) Magic-angle-spinning solid-state NMR applied to polypeptides and proteins, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **55**, 121-158.
215. Smith, S. O., Aschheim, K., et Groesbeek, M. (1996) Magic angle spinning NMR spectroscopy of membrane proteins, *Q. Rev. Biophys.* **29**, 395-449.
216. Smith, S. O., et Griffin, R. G. (1988) High-resolution solid-state NMR of proteins, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **39**, 511-535.
217. Grage, S. L., et Watts, A. (2007) Applications of REDOR for distance measurements in biological solids, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **60**, 191-228.
218. Griffin, R. G. (1998) Dipolar recoupling in MAS spectra of biological solids, *Nature Struct. Biol. NMR Suppl.*, 508-512.
219. Gullion, T. (1998) Introduction to rotational-echo double-resonance NMR, *Concepts Magn. Reson.* **10**, 277-289.
220. Kovacs, F. A., Fowler, D. J., Gallagher, G. J., et Thompson, L. K. (2007) A practical guide for solid-state NMR distance measurements in proteins, *Concepts Magn. Reson.* **30A**, 21-39.
221. Toke, O., Cegelski, L., et Schaefer, J. (2006) Peptide antibiotics in action: investigation of polypeptide chains in insoluble environments by rotational-echo double resonance, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1314-1329.
222. Mueller, K. T. (1995) Analytic solutions for the time evolution of dipolar-dephasing NMR signals, *J. Magn. Reson.* **113A**, 81-93.
223. Herzfeld, J., et Berger, A. E. (1980) Sideband intensities in NMR spectra of samples spinning at the magic angle, *J. Chem. Phys.* **73**, 6021-6030.
224. Buffy, J. J., Waring, A. J., Lehrer, R. I., et Hong, M. (2003) Immobilization and aggregation of the antimicrobial peptide protegrin-1 in lipid bilayers investigated by solid-state NMR, *Biochemistry* **42**, 13725-13734.
225. Atkins, P. W. (2000) *Chimie Physique*, De Boeck Université, Bruxelles, 1015 p.
226. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., et Morrill, T. C. (1998) *Identification spectrométrique de composés organiques*, De Boeck Université, Bruxelles, 420 p.
227. Mantsch, H. H., et McElhaney, R. N. (1991) Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy, *Chem. Phys. Lipids* **57**, 213-226.
228. Mendelsohn, R., et Mantsch, H. H. (1986) in *Progress in Protein-Lipid Interactions* (Pont, A. W. a. J. J. H. H. M. D., Ed.), Elsevier, Amsterdam, pp.103-146.
229. Tamm, L. K., et Tatulian, S. A. (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, *Q. Rev. Biophys.* **30**, 365-429.
230. Lewis, R. N. A. H., et McElhaney, R. N. (1998) The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy, *Chem. Phys. Lipids* **96**, 9-21.

231. Blume, A., Hubner, W., et Messner, G. (1988) Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ -labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups, *Biochemistry* **27**, 8239-8249.
232. Lewis, R. N. A. H., McElhaney, R. N., Pohle, W., et Mantson, H. H. (1994) Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerol bilayers: a reevaluation, *Biophys. J.* **67**, 2367-2375.
233. Griffiths, P. R., et Pariente, G. L. (1986) Introduction to spectral deconvolution, *Trends Anal. Chem.* **5**, 209-215.
234. Arrondo, J. L. R., et Goni, F. M. (1998) Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes, *Chem. Phys. Lipids* **96**, 53-68.
235. Andersson, D. I. (2003) Persistence of antibiotic resistant bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 452-456.
236. Cloete, T. E. (2003) Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds, *Int. Biodet. Biodeg.* **51**, 277-282.
237. Livermore, D. M. (2003) Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact, *Clin. Infect. Diseases* **36**, S11-23.
238. Sitaram, N., et Nagaraj, R. (1999) Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity, *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 29-54.
239. Andreu, D., et Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers* **47**, 415-433.
240. Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides, *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 55-70.
241. Stark, M., Liu, L.-P., et Deber, C. M. (2002) Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3585-3590.
242. Tam, J. P., Lu, Y.-A., et Yang, J.-L. (2002) Antimicrobial dendrimeric peptides, *Eur. J. Biochem.* **269**, 923-932.
243. Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., Wahlin, B., et Merrifield, R. B. (1989) Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids, *FEBS Lett.* **259**, 103-106.
244. Kim, H. K., Lee, D. G., Park, Y., Kim, H. N., Choi, B. H., Choi, C.-H., et Hahm, K.-S. (2002) Antibacterial activities of peptides designed as hybrids of antimicrobial peptides, *Biotechnol. Lett.* **24**, 347-353.
245. Shin, S. Y., Kang, J. H., Lee, M. K., et Hahm, K.-S. (1996) Antibacterial activities of peptides designed as hybrids of antimicrobial peptides, *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 545-548.
246. Zhang, L., Rozek, A., et Hancock, R. E. W. (2001) Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes, *J. Biol. Chem.* **276**, 35714-35722.
247. Epand, R. F., Schmitt, M. A., Gellman, S. H., Sen, A., Auger, M., Hughes, D. W., et Epand, R. M. (2005) Bacterial species selective toxicity of two isomeric alpha/beta peptides: role of membrane lipids, *Mol. Membr. Biol.* **22**, 457-469.
248. Epand, R. F., Umezawa, N., Porter, E. A., Gellman, S. H., et Epand, R. M. (2003) Interactions of the antimicrobial β -peptide β -17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins, *Eur. J. Biochem.* **270**, 1240-1248.

249. Schmitt, M. A., Weisblum, B., et Gellman, S. H. (2004) Unexpected relationship between structure and function in α,β -peptides: antimicrobial foldamers with heterogeneous backbones, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6848-6849.
250. Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., et Bienert, M. (1996) Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes, *Biochemistry* **35**, 12612-12622.
251. Epand, R. M., Shai, Y., Segrest, J. P., et Anantharamaiah, G. M. (1995) Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides, *Biopolymers* **37**, 319-338.
252. Kiyota, T., Lee, S., et Sugihara, G. (1996) Design and synthesis of amphiphilic α -helical model peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes, *Biochemistry* **35**, 13196-13204.
253. Duclouhier, H. (2002) How do channel- and pore-forming helical peptides interact with lipid membranes and how does this account for their antimicrobial activity?, *Mini Rev. Med. Chem.* **2**, 331-342.
254. Bechinger, B. (1997) Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin, *J. Membr. Biol.* **156**, 197-211.
255. Cross, G. G., Fyles, T. M., James, T. D., et Zojaji, M. (1996) Design and synthesis of artificial ion channels, *Synlett*, 449-460.
256. Gokel, G. W., et Murillo, O. (1996) Synthetic organic chemical models for transmembrane channels, *Acc. Chem. Res.* **29**, 425-432.
257. Gokel, Q. W., et Mukhopadhyay, A. (2001) Synthetic models of cation-conducting channels, *Chem. Soc. Rev.* **30**, 274-286.
258. Akerfeldt, K. S., Lear, J. D., Wasserman, Z. R., Chung, L. A., et DeGrado, W. F. (1993) Synthetic peptides as models for ion channel protein, *Acc. Chem. Res.* **26**, 191-197.
259. Lear, J. D., Schneider, J. P., Kienker, P. K., et DeGrado, W. F. (1997) Electrostatic effects on ion selectivity and rectification in designed ion channel peptides, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3212-3217.
260. Lear, J. D., Wasserman, Z. R., et DeGrado, W. F. (1988) Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels, *Science* **240**, 1177-1181.
261. Fernandez-Lopez, S., Kim, H.-S., Choi, E. C., Delgado, M., Granja, J. R., Khasanov, A., Kraehenbuehl, K., Long, G., Weinberger, D. A., Wilcoxon, K. m., et Ghadiri, M. R. (2001) Antibacterial agents based on the cyclic D-L- α -peptide architecture, *Nature* **412**, 452-455.
262. Voyer, N., Ptovin, L., et Rousseau, É. (1997) Electrical activity of artificial ion channels incorporated into planar lipid bilayers, *J. Chem. Soc.* **8**, 1469-1471.
263. Voyer, N., et Roby, J. (1991) Design, synthesis, and side-chain binding cooperativity of bis-crown ether peptides, *Tetrahedron Lett.* **32**, 331-334.
264. Pichette, A., Voyer, N., Larouche, R., et Meillon, J. C. (1997) A useful method for the preparation of fully protected peptide acids and esters, *Tetrahedron Lett.* **38**, 1279-1282.
265. Voyer, N., Lavoie, A., Pinette, M., et Bernier, J. (1994) A convenient solid-phase preparation of peptide substituted amides, *Tetrahedron Lett.* **35**, 355-358.

266. Otis, F., Voyer, N., Polidori, A., et Pucci, B. (2006) End group engineering of artificial ion channels, *New J. Chem.* **2**, 185-190.
267. Traikia, M., Warschawski, D. E., Recouvreur, M., Cartaud, J., et Devaux, P. F. (2000) Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and ^{31}P -nuclear magnetic resonance, *Eur. Biophys. J.* **29**, 184-195.
268. Abel, E., Maguire, G. E. M., Murillo, O., Suzuki, I., De Wall, S. L., et Gokel, G. W. (1999) Hydraphile channels: structural and fluorescent probes of position and function in a phospholipid bilayer, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9043-9052.
269. Fyles, T. M., James, T. D., et Kaye, K. C. (1990) Biomimetic ion-transport - on the mechanism of ion-transport by an artificial ion channel mimic, *Can. J. Chem.* **68**, 976-978.
270. Herve, M., Cybulska, B., et Garybobo, C. M. (1985) Cation permeability induced by valinomycin, gramicidin-D and amphotericin-B in large lipidic unilamellar vesicles studied by ^{31}P NMR, *Eur. Biophys. J.* **12**, 121-128.
271. Fyles, T. M., James, T. D., et Kaye, K. C. (1993) Activities and modes of action of artificial ion channel mimics, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12315-12321.
272. Lauger, P. (1985) Mechanisms of biological ion-transport - carriers, channels, and pumps in artificial lipid-membranes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **24**, 905-923.
273. Suarez-Isla, B. A., Wan, k., Lindstrom, J., et Montal, M. (1983) Single-channel recordings from purified acetylcholine receptors reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipets, *Biochemistry* **22**, 2319-2323.
274. Woolley, G. A., Jaikaran, A. S. I., Zhang, Z. H., et Peng, S. Y. (1995) Design of regulated ion channels using measurements of cis-trans isomerization in single molecules, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 4448-4454.
275. Buster, D. C., Hinton, J. F., Millett, F. S., et Shungu, D. C. (1988) ^{23}Na -nuclear magnetic resonance investigation of gramicidin-induced ion transport through membranes under equilibrium conditions, *Biophys. J.* **53**, 145-152.
276. Riddell, F. G., et Hayer, M. K. (1985) The monensin-mediated transport of sodium ions through phospholipid bilayers studied by ^{23}Na -NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **817**, 313-317.
277. Benachir, T., et Lafleur, M. (1996) Osmotic and pH transmembrane gradients control the lytic power of melittin, *Biophys. J.* **70**, 831-840.
278. Ouellet, M., Voyer, N., et Auger, M. (2004) Conformational studies of artificial ion channels in interaction with model membranes by ^2H , ^{31}P and ^{15}N solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* **86**, 204a.
279. Bonev, B. B., Lam, Y.-N., Anderluh, G., Watts, A., Norton, R. S., et Separovic, F. (2003) Effects of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin, *Biophys. J.* **84**, 2382-2392.
280. Huster, D., Yao, X., Jakes, K., et Hong, M. (2002) Conformational changes of colicin Ia channel-forming domain upon membrane binding: a solid-state NMR study, *Biochim. Biophys. Acta* **1561**, 159-170.
281. Balla, M. S., Bowie, J. H., et Separovic, F. (2004) Solid-state NMR study of antimicrobial peptides from Australian frogs in phospholipid membranes, *Eur. Biophys. J.* **33**, 109-116.

282. Banerjee, U., Zidovetzki, R., Birge, R. R., et Chan, S. I. (1985) Interaction of alamethicin with lecithin bilayers: a ^{31}P and ^2H NMR study, *Biochemistry* **24**, 7621-7627.
283. Dave, P. C., Tiburu, E. K., Damodaran, K., et Lorigan, G. A. (2004) Investigating structural changes in the lipid bilayer upon insertion of the transmembrane domain of the membrane-bound protein phospholamban utilizing ^{31}P and ^2H solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* **86**, 1564-1573.
284. Hori, Y., Demura, M., Niidome, T., Aoyagi, H., et Asakura, T. (1999) Orientational behavior of phospholipid membranes with mastoparan studied by ^{31}P solid state NMR, *FEBS Lett.* **455**, 228-232.
285. Hallock, K. J., Henzler Wildman, K., Lee, D.-K., et Ramamoorthy, A. (2002) An innovative procedure using a sublimable solid to align lipid bilayers for solid-state NMR studies, *Biophys. J.* **82**, 2499-2503.
286. Marassi, F. M., et Crowell, K. J. (2003) Hydration-optimized oriented phospholipid bilayer samples for solid-state NMR structural studies of membrane proteins, *J. Magn. Reson.* **161**, 64-69.
287. Moll III, F., et Cross, T. A. (1990) Optimizing and characterizing alignment of oriented lipid bilayers containing gramicidin D, *Biophys. J.* **57**, 351-362.
288. Balgavy, P., Dubnickova, M., Kucerka, N., Kiselev, M. A., Yaradaikin, S. P., et Uhrikova, D. (2001) Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study, *Biochim. Biophys. Acta* **1512**, 40-52.
289. De Planque, M. R. R., Greathouse, D. V., Koeppe II, R. E., Schäfer, H., Marsh, D., et Killian, J. A. (1998) Influence of lipid/peptide hydrophobic mismatch on the thickness of diacylphosphatidylcholine bilayers. A ^2H NMR and ESR study using designed transmembrane α -helical peptides and gramicidin A, *Biochemistry* **37**, 9333-9345.
290. Park, S. H., et Opella, S. J. (2005) Tilt angle of a trans-membrane helix is determined by hydrophobic mismatch, *J. Mol. Biol.* **350**, 310-318.
291. Seelig, J., et Seelig, A. (1980) Lipid conformation in model membrane and biological membranes, *Q. Rev. Biophys.* **13**, 19-61.
292. Dufourc, E. J., Bonmatin, J.-M., et Dufourcq, J. (1989) Membrane structure and dynamics by ^2H - and ^{31}P -NMR. Effects of amphipathic peptidic toxins on phospholipid and biological membranes, *Biochimie* **71**, 117-123.
293. Dufourc, E. J., Smith, I. C. P., et Dufourcq, J. (1986) Molecular details of melittin-induced lysis of phospholipid membranes as revealed by deuterium and phosphorus NMR, *Biochemistry* **25**, 6448-6455.
294. De Planque, M. R. R., Boots, J.-W. P., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J., Greathouse, D. V., et Killian, J. A. (2002) The effects of hydrophobic mismatch between phosphatidylcholine bilayers and transmembrane α -helical peptides depend on the nature of interfacially exposed aromatic and charged residues, *Biochemistry* **41**, 8396-8404.
295. Belohorcova, K., Qian, J., et Davis, J. H. (2000) Molecular dynamics and ^2H -NMR study of the influence of an amphiphilic peptide on membrane order and dynamics, *Biophys. J.* **79**, 3201-3216.

296. Hallock, K. J., Lee, D.-K., et Ramamoorthy, A. (2003) MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain, *Biophys. J.* **84**, 3052-3060.
297. Bechinger, B., Zasloff, M., et Opella, S. J. (1998) Structure and dynamics of the antibiotic peptide PGLa in membranes by solution and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biophys. J.* **74**, 981-987.
298. Bechinger, B., Skladnev, D. A., Ogrel, A., Li, X., Rogozhkina, E. V., Ovchinnikova, T. V., O'Neil, J. D. J., et Raap, J. (2001) ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR investigations on the orientation of Zervamicin II and Alamethicin in phosphatidylcholine membranes, *Biochemistry* **40**, 9428-9437.
299. Benachir, T., Monette, M., Grenier, J., et Lafleur, M. (1997) Melittin-induced leakage from phosphatidylcholine vesicles is modulated by cholesterol: a property used for membrane targeting, *Eur. Biophys. J.* **25**, 201-210.
300. Henzler Wildman, K. A., Martinez, G. V., Brown, M. F., et Ramamoorthy, A. (2004) Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37, *Biochemistry* **43**, 8459-8469.
301. Marcotte, I., Wegener, K. L., Lam, Y.-N., Chia, B. C. S., de Planque, M. R. R., Bowie, J. H., Auger, M., et Separovic, F. (2003) Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes, *Chem. Phys. Lipids* **122**, 107-120.
302. Pott, T., et Dufourc, E. J. (1995) Action of melittin on the DPPC-cholesterol liquid-ordered phase: a solid state ²H- and ³¹P-NMR study, *Biophys. J.* **68**, 965-977.
303. Prenner, E. J., Lewis, R. N. A. H., Jelokhani-Niaraki, M., Hodges, R. S., et McElhaney, R. N. (2001) Cholesterol attenuates the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with phospholipid bilayer membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **1510**, 83-92.
304. Killian, J. A., Salemink, I., de Planque, M. R. R., Lindblom, G., Koeppe II, R. E., et Greathouse, D. V. (1996) Induction of nonbilayer structures in diacylphosphatidylcholine model membranes by transmembrane α -helical peptides: importance of hydrophobic mismatch and proposed role of tryptophans, *Biochemistry* **35**, 1039-1045.
305. Paré, C., Lafleur, M., Liu, F., et Lewis, R. N. A. H. (2001) Differential scanning calorimetry and ²H nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopy studies of the effects of transmembrane α -helical peptides on the organization of phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* **1511**, 60-73.
306. Thennarasu, S., Lee, D.-K., Tan, A., Kari, P., et Ramamoorthy, A. (2005) Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843, *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 49-58.
307. DeGrado, W. F., et Kaiser, E. T. (1980) Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. Preparation of protected peptide fragments, *J. Org. Chem.* **45**, 1295-1300.
308. Rance, M., et Byrd, R. A. (1983) Obtaining high-fidelity spin 1/2 powder spectra in anisotropic media: phase-cycled Hahn echo spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **52**, 221-240.

309. Bennett, A. E., Rienstra, C. M., Auger, M., Lakshmi, K. V., et Griffin, R. G. (1995) Heteronuclear decoupling in rotating solids, *J. Chem. Phys.* **103**, 6951-6958.
310. Sternin, E., Bloom, M., et MacKay, A. L. (1983) De-pake-ing of NMR spectra, *J. Magn. Reson.* **55**, 274-282.
311. Zhang, Y.-P., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., et McElhaney, R. N. (1992) Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane α -helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies, *Biochemistry* **31**, 11579-11588.
312. Sankaram, M. B., et Thompson, T. E. (1990) Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state ^2H nuclear magnetic resonance study, *Biochemistry* **29**, 10676-10684.
313. Guard-Friar, D., Chen, C.-H., et Engle, A. S. (1985) Deuterium isotope effect on the stability of molecules: phospholipids, *J. Phys. Chem.* **89**, 1810-1813.
314. Davis, J. H. (1979) Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biophys. J.* **27**, 339-358.
315. Hallock, K. J., Lee, D.-K., Omnaas, J., Mosberg, H. I., et Ramamoorthy, A. (2002) Membrane composition determines pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption, *Biophys. J.* **83**, 1004-1013.
316. Pokorny, A., et Almeida, P. F. F. (2005) Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by δ -lysin: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides, *Biochemistry* **44**, 9538-9544.
317. Nezil, F. A., et Bloom, M. (1992) Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes, *Biophys. J.* **61**, 1176-1183.
318. McMullen, T. P. W., Lewis, R. N. A. H., et McElhaney, R. N. (1994) Comparative differential scanning calorimetric and FTIR and ^{31}P -NMR spectroscopic studies of the effects of cholesterol and androstenol on the thermotropic phase behavior and organization of phosphatidylcholine bilayers., *Biophys. J.* **66**, 741-752.
319. McMullen, T. P. W., Lewis, R. N. A. H., et McElhaney, R. N. (2000) Differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies of the effects of cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of a homologous series of linear saturated phosphatidylserine bilayer membranes, *Biophys. J.* **79**, 2056-2065.
320. Zhang, Y.-P., Lewis, R. N. A. H., et McElhaney, R. N. (1997) Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of the *n*-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols, *Biophys. J.* **72**, 779-793.
321. Marcotte, I., Ouellet, M., et Auger, M. (2004) Insights on the interaction of met-enkephalin with negatively charged membranes-an infrared and solid-state NMR spectroscopic study, *Chem. Phys. Lipids* **127**, 175-187.
322. Hancock, R. E. W., et Patrzykat, A. (2002) Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics, *Curr. Drug Targets* **2**, 79-83.
323. Marr, A. K., Gooderham, W. J., et Hancock, R. E. W. (2006) Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook, *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 468-472.

324. Aisenbrey, C., Kinder, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., et Bechinger, B. (2006) Interactions involved in the realignment of membrane-associated helices. An investigation using oriented solid-state NMR and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopies, *J. Biol. Chem.* **281**, 7708-7716.
325. Harzer, U., et Bechinger, B. (2000) Alignment of lysine-anchored membrane peptides under conditions of hydrophobic mismatch: a CD, ^{15}N and ^{13}C solid-state NMR spectroscopy, *Biochemistry* **39**, 13106-13114.
326. Vogt, B., Ducarne, P., Schinzel, S., Brasseur, R., et Bechinger, B. (2000) The topology of lysine-containing amphipathic peptides in bilayers by circular dichroism, solid-state NMR, and molecular modeling, *Biophys. J.* **79**, 2644-2656.
327. Bechinger, B., Aisenbrey, C., et Bertani, P. (2004) The alignment, structure and dynamics of membrane-associated polypeptides by solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 190-204.
328. Bak, M., Bywater, R. P., Hohwy, M., Thomsen, J. K., Adelhorst, K., Jakobsen, H. J., Sorensen, O. W., et Nielsen, N. C. (2001) Conformation of alamethicin in oriented phospholipid bilayers determined by ^{15}N solid-state nuclear magnetic resonance, *Biophys. J.* **81**, 1684-1698.
329. Mecke, A., Lee, D.-K., Ramamoorthy, A., Orr, B. G., et Banaszak Holl, M. M. (2005) Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers, *Biophys. J.* **89**, 4043-4050.
330. Ouellet, M., Bernard, G., Voyer, N., et Auger, M. (2006) Insights on the interactions of synthetic amphipathic peptides with model membranes as revealed by ^{31}P and ^2H solid-state NMR and infrared spectroscopies, *Biophys. J.* **90**, 4071-4084.
331. Petrache, H. I., Dodd, S. W., et Brown, M. F. (2000) Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by ^2H NMR spectroscopy, *Biophys. J.* **79**, 3172-3192.
332. Buffy, J. J., McCormick, M. J., Wi, S., Waring, A., Lehrer, R. I., et Hong, M. (2004) Solid-state NMR investigation of the selective perturbation of lipid bilayers by the cyclic antimicrobial peptide RTD-1, *Biochemistry* **43**, 9800-9812.
333. Mani, R., Waring, A. J., Lehrer, R. I., et Hong, M. (2005) Membrane-disruptive abilities of β -hairpin antimicrobial peptides correlate with conformation and activity: a ^{31}P and ^1H NMR study, *Biochim. Biophys. Acta* **1716**, 11-18.
334. Mani, R., Buffy, J. J., Waring, A., Lehrer, R. I., et Hong, M. (2004) Solid-state NMR investigation of the selective disruption of lipid membranes by protegrin-1, *Biochemistry* **43**, 13839-13848.
335. Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R. I., et Hong, M. (2002) Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, *Biochemistry* **41**, 9852-9862.
336. Bechinger, B., Zasloff, M., et Opella, S. J. (1993) Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Protein Sci.* **2**, 2077-2084.
337. Marassi, F. M., Opella, S. J., Juvvadi, P., et Merrifield, R. B. (1999) Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* **77**, 3152-3155.

338. Porcelli, F., Buck, B., Lee, D.-K., Hallock, K. J., Ramamoorthy, A., et Veglia, G. (2004) Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes, *J. Biol. Chem.* **279**, 45815-45823.
339. Henzler Wildman, K. A., Lee, D.-K., et Ramamoorthy, A. (2003) Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37, *Biochemistry* **42**, 6545-6558.
340. Mattila, K., Kinder, R., et Bechinger, B. (1999) The alignment of a voltage-sensing peptide in dodecylphosphocholine micelles and in oriented lipid bilayers by nuclear magnetic resonance and molecular modeling, *Biophys. J.* **77**, 2102-2113.
341. Sudheendra, U. S., et Bechinger, B. (2005) Topological equilibria of ion channel peptides in oriented lipid bilayers revealed by ¹⁵N solid-state NMR spectroscopy, *Biochemistry* **44**, 12120-12127.
342. Toke, O., Maloy, W. L., Kim, S. J., Blazyk, J., et Schaefer, J. (2004) Secondary structure and lipid contact of a peptide antibiotic in phospholipid bilayers by REDOR, *Biophys. J.* **87**, 662-674.
343. Hirsh, D. J., Hammer, J., Maloy, W. L., Blazyk, J., et Schaefer, J. (1996) Secondary structure and location of a magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers, *Biochemistry* **35**, 12733-12741.
344. Matsuzaki, K., Sugishita, K.-i., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K., et Eppand, R. M. (1998) Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2, *Biochemistry* **37**, 11856-11863.
345. Ramamoorthy, A., Thennarasu, S., Lee, D.-K., Tan, A., et Maloy, L. (2006) Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin, *Biophys. J.* **91**, 206-216.
346. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., et Ernst, R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **71**, 4546-4553.
347. Picard, F., Paquet, M.-J., Dufourc, E. J., et Auger, M. (1998) Measurement of the lateral diffusion of dipalmitoylphosphatidylcholine adsorbed on silica beads in the absence and presence of melittin: a ³¹P two-dimensional exchange solid-state NMR study, *Biophys. J.* **74**, 857-868.
348. Fenske, D. B., et Jarrell, H. C. (1991) Phosphorus-31 two-dimensional solid-state exchange NMR. Application to model membrane and biological systems, *Biophys. J.* **59**, 55-69.
349. Baker, M. A., Maloy, W. L., Zasloff, M., et Jacob, L. S. (1993) Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides, *Cancer Res.* **53**, 3052-3057.
350. Papo, N., et Shai, Y. (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment, *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 784-790.
351. Soballe, P. W., Maloy, W. L., Myrnga, M. L., Jacob, L. S., et Herlyn, M. (1995) Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides, *Int. J. Cancer* **60**, 280-284.
352. Tone Eliassen, L., Berge, G., Leknessund, A., Wikman, M., Lindin, I., Lokke, C., Ponthan, F., Johnsen, J. I., Sveinbjornsson, B., Kogner, P., Flaegstad, T., et Rekdal, O. (2006) The antimicrobial peptide, Lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells *in vitro* and inhibits xenograft growth *in vivo*, *Int. J. Cancer* **119**, 493-500.

353. Doyle, J., Brinkworth, C. S., Wegener, K. L., Carver, A., Llewellyn, L. E., Olver, I. N., Bowie, J. H., Wabnitz, P. A., et Tyler, M. J. (2003) nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications. The solution structure of a modified citropin 1.1., *Eur. J. Biochem.* **270**, 1141-1153.
354. Ye, J.-S., Zheng, X.-J., Leung, K. W., Chen, H. M., et Sheu, F.-S. (2004) Induction of transient ion channel-like pores in a cancer cell by antibiotic peptide, *J. Biochem.* **136**, 255-259.
355. Bradshaw, J. P. (2003) Cationic antimicrobial peptides, *Biodrugs* **17**, 233-240.
356. Loose, C., Jensen, I., et Stephanopoulos, G. (2006) A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides, *Nature* **443**, 867-869.
357. Leontiadou, H., Mark, A. E., et Marrink, S. J. (2006) Antimicrobial peptides in action, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12156-12161.
358. Fyles, T. M. (2007) Synthetic ion channels in bilayer membranes, *Chem. Soc. Rev.* **36**, 335-347.
359. Leuschner, C., et Hansel, W. (2004) Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments, *Curr. Pharma. Des.* **10**, 2299-2310.
360. Davis, J. H., et Auger, M. (1999) Static and magic angle spinning NMR of membrane peptides and proteins, *Prog. NMR Spectrosc.* **35**, 1-84.
361. Thennarasu, S., Lee, D.-K., Poon, A., Kawulka, K. E., Vederas, J. C., et Ramamoorthy, A. (2005) Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A, *Chem. Phys. Lipids* **137**, 38-51.
362. Bechinger, B. (2001) Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: a ¹⁵N solid-state NMR spectroscopy investigation, *Biophys. J.* **81**, 2251-2258.
363. Park, S. H., Mrse, A. A., Nevzorov, A. A., De Angelis, A. A., et Opella, S. J. (2006) Rotational diffusion of membrane proteins in aligned phospholipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **178**, 162-165.
364. Seelig, J. (1977) Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes, *Q. Rev. Biophys.* **10**, 353-418.
365. Loudet, C., Khemtémourian, L., Aussenac, F., Gineste, S., Achard, M.-F., et Dufourc, E. J. (2005) Bicelle membranes and their use for hydrophobic peptide studies by circular dichroism and solid state NMR, *Biochim. Biophys. Acta* **1724**, 315-323.
366. Aisenbrey, C., et Bechinger, B. (2004) Tilt and rotational pitch angle of membrane-inserted polypeptides from combined ¹⁵N and ²H solid-state NMR spectroscopy, *Biochemistry* **43**, 10502-10512.
367. Traaseth, N. J., Buffy, J. J., Zmoon, J., et Veglia, G. (2006) Structural dynamics and topology of phospholamban in oriented lipid bilayers using multidimensional solid-state NMR, *Biochemistry* **45**, 13827-13834.
368. Wishart, D. S., Sykes, B. D., et Richards, F. M. (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure, *J. Mol. Biol.* **222**, 311-333.
369. Karp, E. S., Tiburu, E. K., Abu-Baker, S., et Lorigan, G. A. (2006) The structural properties of the transmembrane segment of the integral membrane protein phospholamban utilizing ¹³C CPMAS, ²H, and REDOR solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 772-780.

370. Kimura, S., Naito, A., Tuzi, S., et Saito, H. (2002) Dynamic structure of transmembrane α -helical fragments of bacteriorhodopsin in lipid bilayer characterized by ^{13}C chemical shift tensor and hydrogen bond distance by REDOR NMR, *J. Mol. Struct.* **602-603**, 125-131.
371. Segrest, J. P. (1977) Amphipathic helices and plasma lipoproteins: thermodynamic and geometric considerations, *Chem. Phys. Lipids* **18**, 7-22.
372. Ouellet, M., Doucet, J.-D., Voyer, N., et Auger, M. (2007) Membrane topology of a 14-mer model amphipathic peptide: a solid-state NMR spectroscopy study, *Biochemistry* **46**, 6597-6606.
373. Duclohier, H. (1994) Anion pores from magainins and related defensive peptides, *Toxicology* **87**, 175-188.
374. Duclohier, H., Molle, G., et Spach, G. (1989) Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers, *Biophys. J.* **56**, 1017-1021.
375. Juretic, D., Hendler, R. W., Kamp, F., Caughey, W. S., Zasloff, M., et Westerhoff, H. V. (1994) Magainin oligomers reversibly dissipate $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ in cytochrome oxidase liposomes, *Biochemistry* **33**, 4562-4570.
376. Brahmachary, M., Krishnan, S. P. T., Koh, J. L. Y., Khan, A. M., Seah, S. H., Tan, T. W., Brusica, V., et Bajic, V. B. (2004) ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences, *Nucleic Acids Res.* **32**, D586-D589.
377. Wang, Z., et Wang, G. (2004) APD: the antimicrobial peptide database, *Nucleic Acids Res.* **32**, D590-D592.
378. Wade, D., et Englund, J. (2002) Synthetic antibiotic peptides database, *Protein Peptide Lett.* **9**, 53-57.
379. Tossi, A., et Sandri, L. (2002) Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides, *Curr. Pharma. Des.* **8**, 743-761.
380. Moskowitz, S. M., Ernst, R. K., et Miller, S. I. (2004) PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A, *J. Bacteriol.* **186**, 575-579.
381. Peschel, A., et Sahl, H.-G. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 529-536.
382. Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., et Götz, F. (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides, *J. Biol. Chem.* **274**, 8405-8410.
383. Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W. F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K. P. M., et van Strijp, J. A. G. (2001) *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine, *J. Exp. Med.* **193**, 1067-1076.
384. Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M., et Miller, S. I. (1999) Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*, *Science* **286**, 1561-1565.

385. Finlay, B. B., et Hancock, R. E. W. (2004) Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections ?, *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 497-504.