



Caractérisation du peptide fluoré LX2 pour le développement d'un nouveau canal ionique membranaire

Mémoire

Maud Sophie Victoire Auger

Maîtrise en chimie

Maître ès science (M. Sc.)

Québec, Canada

© Maud Sophie Victoire Auger, 2017

Caractérisation du peptide fluoré LX2 pour le développement d'un nouveau canal ionique membranaire

Mémoire

Maud Sophie Victoire Auger

Sous la direction de :

Michèle Auger, directrice de recherche

Normand Voyer, codirecteur de recherche

Résumé

Dans le but de développer un canal ionique membranaire à visée nanochimiothérapeutique, ce mémoire présente la synthèse et la caractérisation des peptides fluorés LX2 et LX2 acétylé lorsqu'ils interagissent avec des modèles de membranes cellulaires. Ces peptides s'inspirent du peptide LS2 (LSLLLSL)₃, un polypeptide de 21 acides aminés composé de résidus leucine et sérine, qui a été développé et caractérisé par le groupe du Pr W.F. DeGrado. Dans le cas du LX2 (LXLLLXL)₃, les sérines ont été remplacées par des acides 2-amino-4,4,4-trifluorobutyrique. Des études de modélisation antérieures suggèrent que ce peptide membranaire s'auto-assemble en tétramère dans des membranes phospholipidiques. Différentes techniques ont été utilisées pour caractériser le LX2 et sa forme acétylée, ainsi que leurs interactions avec des membranes modèles de type eucaryote formées de POPC et de cholestérol. Le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge ont permis de déterminer la structure secondaire des peptides en solution et au sein des membranes. La spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire ont donné de l'information sur les perturbations induites par les peptides sur les membranes. La séquence CODEX utilisée en spectroscopie RMN des solides a constitué une première étape afin de mettre en évidence l'oligomérisation des peptides.

Table des matières

Résumé	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Abréviations	ix
Remerciements	xii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Les propriétés des peptides thérapeutiques.....	1
1.2 Les peptides fluorés	3
1.3 L'inspiration du peptide LX2	4
1.4 Travaux antérieurs sur LX2	7
1.4.1 Synthèse peptidique.....	7
1.4.2 Travaux de modélisation	7
1.4.3 Formation d'un canal ionique.....	9
1.5 Objectifs.....	12
Chapitre 2 : Partie expérimentale	15
2.1 Synthèse peptidique	15
2.2 Matériel et méthodes.....	16
2.2.1 Dichroïsme circulaire	17
2.2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	18
2.2.3 Spectroscopie RMN des solides	19
Chapitre 3 : Caractérisation des peptides LX2 et LX2 acétylé.....	22
3.1 Principe	22
3.1.1 La source MALDI	22
3.1.2 L'analyseur TOF	22
3.1.3 Le détecteur	23
3.2 Résultats.....	23
Chapitre 4 : Détermination de la structure secondaire des peptides LX2 et LX2 acétylé par dichroïsme circulaire	26
4.1 Principe du dichroïsme circulaire	26
4.2 Résultats.....	28
4.2.1 Peptides en solution.....	28
4.2.2 Peptides dans les membranes modèles	29
4.2.3 Effet de la concentration de peptides.....	31
4.2.4 Stabilité conformationnelle des peptides en fonction de la température	33
Chapitre 5 : Étude des peptides LX2 et LX2 acétylé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF).....	37
5.1 Principe de la spectroscopie IR.....	37
5.1.1 La bande amide I'	38
5.1.2 Le thermotropisme des lipides.....	39
5.1.3 Transition de phase des chaînes lipidiques.....	39
5.1.4 Transition de phase des têtes polaires des lipides.....	40
5.2 Résultats.....	41
5.2.1 Bande amide I'	41

5.2.2	Chaînes acyle des lipides.....	44
5.2.3	Région interfaciale des lipides.....	46
Chapitre 6 : Étude des peptides LX2 et LX2 acétylé par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire des solides		
6.1	Principe de la RMN ³¹ P	48
6.1.1	Résultats	50
6.2	Principe de la RMN ² H	51
6.2.1	Résultats	53
6.3	Principe de la RMN ¹⁹ F	55
6.3.1	Résultats	55
6.4	Rotation à l'angle magique	57
6.4.1	Résultats	58
Chapitre 7 : Étude de l'oligomérisation des peptides par CODEX		
7.1	CODEX ¹⁹ F.....	61
7.2	CODEX RMN ¹³ C	64
Chapitre 8 : Conclusions.....		
8.1	Travaux en cours.....	69
8.2	Travaux futurs.....	70
Chapitre 9 : Bibliographie		
		72

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Composition lipidique moyenne des cellules eucaryotes	13
Tableau 7.1. Distances calculées entre groupements carbonyle dans le cas de trimères telles que déterminées par modélisation pour LX2 et LX2-Ac	65
Tableau 7.2. Distances calculées entre groupements carbonyle dans le cas de tétramères telles que déterminées par modélisation pour LX2 et LX2-Ac	66

Liste des figures

Figure 1.1. Projection (en mode roue axiale) de l'hélice- α du peptide LS2 et des acides aminés (S : sérine et L :leucine).....	5
Figure 1.2. Représentation du tétramère du peptide LS2	6
Figure 1.3. Séquence des peptides LX2 et LX2 acétylé (LX2-Ac) avec la représentation des acides aminés leucine (L) et 2-amino-4,4,4-trifluorobutyrique (X)	7
Figure 1.4. Projection (en mode roue axiale) de l'hélice- α du peptide LX2.....	8
Figure 1.5. Représentation du tétramère formé par le LX2 telle que calculée par modélisation	8
Figure 1.6. Molécule de calcéine.....	9
Figure 1.7. Schéma de la formation de pores membranaires et de libération de la calcéine	10
Figure 1.8. Courbes de transport ionique à travers des membranes phospholipidiques modèles pour les ions sodium, le potassium et le césium.....	11
Figure 1.9. Comparaison de l'efficacité de transport des ions sodium pour les peptides LS2 et LX2.....	11
Figure 1.10. Schéma d'une membrane de cellule eucaryote.....	13
Figure 1.11. Structure de la POPC et du cholestérol	14
Figure 3.1. Spectre MALDI-TOF du peptide LX2.....	24
Figure 3.2. Spectre MALDI-TOF du peptide LX2-Ac.....	25
Figure 4.1. Schéma du principe de la spectroscopie CD	26
Figure 4.2. Spectres CD typiques des structures secondaires des peptides et des protéines	27
Figure 4.3. Spectres CD des peptides LX2 et LX2-Ac en solution dans le HFIP	29
Figure 4.4. Spectres CD du peptide LX2 dans des membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol	30
Figure 4.5. Spectres CD du peptide LX2-Ac dans des membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol	31
Figure 4.6. Spectres CD du peptide LX2 à différents rapports molaires dans des membranes de POPC-cholestérol	32
Figure 4.7. Rapport de l'ellipticité molaire à 208 et 222 nm en fonction du rapport molaire peptide:lipide (P:L).....	33
Figure 4.8. Spectres CD du LX2 en fonction de la température	34
Figure 4.9. Spectres CD du LX2-Ac en fonction de la température	34
Figure 4.10. Spectres CD du peptide LX2 dans des membranes de POPC-cholestérol à 25 °C et 80 °C.....	36
Figure 4.11. Spectres CD du peptide LX2-Ac dans des membranes de POPC-cholestérol à 25 °C et 80 °C.....	36
Figure 5.1. Spectre IR représentatif d'un mélange peptide-lipides avec les bandes d'élongation symétrique des groupements CH ₂ , la bande l'élongation des groupements carbonyle et la bande amide I'	38
Figure 5.2. Schéma de la transition de phase	39
Figure 5.3. Spectre IR brut et déconvolué de la bande d'élongation des groupements carbonyle des phospholipides.....	40
Figure 5.4. Bandes amide I' des peptides LX2 et LX2-Ac à 37 °C en présence de membranes composées de POPC et de cholestérol.....	41

Figure 5.5. Bandes amide I' des peptides LX2 et LX2-Ac de la Figure 5.4 et leur déconvolution de Fourier.....	42
Figure 5.6. Bande amide I' du peptide LX2 en présence de membranes modèles eucaryotes à différentes températures	43
Figure 5.7. Bande amide I' du peptide LX2-Ac en présence de membranes modèles eucaryotes à différentes températures.....	44
Figure 5.8. Position de la bande d'élongation symétrique des CH ₂ en fonction de la température pour le mélange POPC-cholestérol, en absence et en présence de LX2 et LX2-Ac	45
Figure 5.9. Position de la bande d'élongation des groupements carbonyle des phospholipides en fonction de la température pour le mélange POPC-cholestérol, en absence et en présence de LX2 et LX2-Ac.....	47
Figure 6.1. Spectres RMN ³¹ P des différentes phases lipidiques. Spectre de poudre obtenu avec une phase solide; phase gel; phase fluide; micelles	49
Figure 6.2 Spectres RMN ³¹ P de membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol.....	50
Figure 6.3 Spectres RMN ³¹ P à des membranes modèles, des membranes avec le peptide LX2 et des membranes avec le peptide LX2-Ac.....	51
Figure 6.4 Spectres RMN ² H de la POPC-d ₃₁	52
Figure 6.5 Spectres RMN ² H de membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol.....	53
Figure 6.6 Spectres RMN ² H des membranes modèles seules, et en présence de LX2, et de LX2-Ac.....	54
Figure 6.7 Spectres RMN ¹⁹ F du peptide LX2 et du peptide LX2-Ac dans les membranes modèles de type eucaryote.....	56
Figure 6.8 Spectre RMN ¹⁹ F de peptide LX2 dans les membranes modèles; spectre RMN ¹⁹ F de la dilution au 1 000ème du TFA dans le tampon; spectre RMN ¹⁹ F du TFA.....	57
Figure 6.9 Schéma du principe de la rotation à l'angle magique	58
Figure 6.10 Spectre RMN ¹⁹ F en rotation à l'angle magique des peptides LX2 et LX2-Ac	59
Figure 7.1. Séquence d'impulsions de CODEX.....	61
Figure 7.2. Courbes de l'analyse CODEX du peptide LX2 dans des membranes POPC:cholestérol (P:L 4:100) en RMN ¹⁹ F à -40 °C.....	62
Figure 7.3. Courbes de l'analyse CODEX du peptide LX2 dans des membranes POPC:cholestérol (P:L 2:100) en RMN ¹⁹ F à -40 °C.....	63
Figure 7.4. Spectre RMN ¹³ C en rotation à l'angle magique (5 000 Hz) dans des membranes modèles en présence du peptide LX2 en abondance naturelle; du peptide marqué; spectre de soustraction entre le spectre avec et sans peptide marqué.....	67

Abréviations

[θ]	Ellipticité molaire
6Cl-HOBt	6-Chloro-1-hydroxybenzotriazole
ADC	Anisotropie de déplacement chimique
B ₀	Champ magnétique
<i>c</i>	Concentration en peptide
CD	Dichroïsme circulaire
CH ₂	Groupement méthylène
CODEX	<i>Centerband-only detection of exchange</i>
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	Groupement protecteur fluorénylméthoxy-carbonyl
GPMV	<i>Giant plasma membrane vesicles</i>
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yl)oxy)méthaniminium
HCTU	Hexafluorophosphate de <i>O</i> -(6-chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium
HEPES	Acide 4-(2-Hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HFIP	Hexafluoroisopropanol
IR	Infrarouge
IR-TF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<i>l</i>	Largeur de la cellule
LS2	H-(LSLLLSL) ₃ -OH
LX2	H-(LXLLLXL) ₃ -OH
LX2-Ac	Ac-(LXLLLXL) ₃ -OH
M	Équilibre de S/S ₀
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
Mp	Poids moléculaire du peptide
<i>n</i>	Nombre de résidus
P:L	Rapport molaire peptide:lipide
POPC	1-Palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphatidylcholine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMNs	Résonance magnétique nucléaire des solides
S	Spectre CODEX
S ₀	Spectre de référence du CODEX
TFA	Acide trifluoroacétique

t_m	Temps de mélange
T_m	Température de transition de phase des phospholipides
TOF	<i>Time of flight</i>
X	Acide 2-amino-4,4,4-trifluorobutyrique
α -Tfm	α -trifluorométhyle
δ_{aniso}	Constante d'anisotropie de déplacement chimique
δ_{iso}	Déplacement chimique isotrope
$[\theta]$	Ellipticité molaire ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$)
θ	Angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique
ν	Fréquence

« Un pessimiste voit la difficulté dans chaque opportunité,
un optimiste voit l'opportunité dans chaque difficulté. »

- Winston Churchill

Remerciements

Je ne pourrais commencer ce mémoire sans remercier mes superviseurs. Michèle Auger, je te suis infiniment reconnaissante des opportunités que tu m'as données en me confiant ce projet et en me permettant de participer à des congrès. La liberté et l'autonomie que tu m'as laissées pour ce projet ont été très appréciées. Merci aussi à mon co-directeur Normand Voyer, toi aussi tu m'as fait confiance en me permettant de travailler sur ce projet, tu es toujours très optimiste; ton dynamisme fait toujours plaisir à voir. Merci au Pr Patrick Lagüe pour son implication pour la partie bioinformatique du projet.

Ce projet de recherche n'aurait pu avancer sans l'aide des professionnels de recherche que je tiens à remercier. Tout d'abord à Thierry Lefèvre, tu es toujours disponible pour répondre à la moindre de mes questions, tu m'as appris à être une meilleure scientifique autant d'un point de vue de la réflexion mais aussi de la rédaction, tu as joué un grand rôle pour que ce mémoire aboutisse et je t'en suis très reconnaissante. Tu m'as aussi beaucoup enseigné sur l'environnement qui est un sujet auquel je porte une grande attention. Ensuite, à François Otis, tu m'as beaucoup aidée, surtout dans le lab d'orga. Garde ta bonne humeur, c'est toujours un plaisir de venir te voir et de discuter avec toi. Merci à Pierre Audet, tu es capable de résoudre tous les problèmes, tu as toujours une solution. Merci pour les longues heures passées au RMN à résoudre le moindre de mes soucis, je suis impressionnée par toute l'aide en RMN que tu as réussi à m'apporter. Puis à François Paquet-Mercier, quand le spectro IR était capricieux tu as été capable de le réparer rapidement.

Ce projet de maîtrise ne serait pas le même sans l'aide de mes collègues. Pour commencer, Marie-Claude et Benjamin, vous m'avez beaucoup aidée avec vos suggestions et vos explications quand je n'arrivais plus à avancer, vos critiques sont toujours constructives et appréciées et je n'oublierai jamais votre perfectionnisme. Vous n'avez pas seulement été deux collègues, mais deux bons amis avec qui j'ai passé de très bons moments au labo et aussi en dehors, vous avez été d'un grand soutien. À Matthieu merci de m'avoir transmis ton savoir pour les différentes manip. Je ne suis pas prête d'oublier notre agréable voyage au Japon. À toi Justine, Manchot impératrice éternelle et collègue de jujubes, ta constante jovialité a grandement contribué à la très bonne ambiance au bureau. Merci aux autres

membres du groupe et aussi au groupe Voyer pour ces bons moments passés en votre compagnie.

Tout au long de cette maîtrise, j'ai eu la chance de rencontrer et de profiter de moments privilégiés, en dehors du cadre du travail, grâce à mes colocataires : Cecilia, Charlotte, Marie-Pier, Myriam et Rose-Anne; et mes amis (d'ici et d'ailleurs). À toi Thibault, tu as décidé d'embarquer dans le même bateau et venir de ce bord de l'Atlantique, cette aventure n'aurait pas été la même sans toi.

Je ne pourrais exprimer toute la reconnaissance que j'ai envers ma famille, mes parents, mon frère Alexis, Corinne, Agathe, vous êtes toujours d'un grand soutien et je n'en serais pas là aujourd'hui sans vous.

Au-delà d'un travail de maîtrise, ce projet s'inscrit dans un souhait remontant à mon enfance, celui de faire mon possible pour tenter d'aider les personnes malades, par la voie de la chimie. Cette maîtrise aura été avant tout une expérience formidable, tant sur le plan professionnel qu'humain. Et j'espère de tout cœur que celle-ci ne sera qu'une première étape dans ma vie professionnelle, en employant la chimie au service de la santé.

Je tiens bien évidemment à remercier ceux qui prendront le temps de lire et d'apprécier ce mémoire, le reflet de mes deux premières années québécoises. Je tiens par ailleurs à m'excuser auprès de personnes non citées ici, mais qui auront eu un impact dans ma vie.

Merci au support financier du CRSNG, FRQNT, PROTEO, CERMA, CQMF et de l'Université Laval.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Les propriétés des peptides thérapeutiques

Les progrès dans le domaine des médicaments ont commencé au siècle dernier à l'époque de la première guerre mondiale avec les découvertes de la morphine, de la pénicilline, mais aussi de l'insuline dans les années 1920^{1,2}. Cette dernière a permis une avancée majeure dans le domaine des peptides. À cette époque, l'industrie du médicament s'était tournée vers les petites molécules qui étaient faciles à produire, à administrer et ayant de bonnes propriétés pharmacodynamiques, laissant les peptides de côté en raison de leur dégradation rapide dans le corps par des protéases. Au XXI^{ème} siècle, le secteur pharmaceutique fait face à une réglementation plus stricte, avec notamment de nouvelles normes³. Pour obtenir des autorisations de mise sur le marché, les médicaments doivent répondre à de nombreux critères comme la faible toxicité, la tolérance, le mode d'administration, la pharmacodynamique et la pharmacocinétique. Le mode de production doit être le moins coûteux possible, et finalement seules 10% des molécules médicamenteuses vont répondre aux normes entre le moment de leur identification et la mise sur le marché. Tout cela pousse donc les laboratoires à élargir leur champ de recherche notamment en se tournant vers le développement de nouveaux médicaments, incluant des peptides naturels ou synthétiques³. Au cours des dernières années, des études ont démontré que des peptides provenant de certaines muqueuses ou de venin de certains animaux pouvaient être de bons candidats pour le traitement de la douleur, des maladies neurologiques et cardiovasculaires ou les cancers⁴.

La *Food and Drug Administration* (FDA) a accepté plus de 130 protéines et peptides différents à des fins thérapeutiques et beaucoup d'autres sont en cours de développement⁵. Il existe plusieurs avantages à d'utiliser des protéines ou peptides thérapeutiques. Tout d'abord leurs fonctions spécifiques et complexes ne peuvent être produites avec des composés chimiques simples. Ensuite leurs actions très spécifiques permettent de diminuer les interactions avec le système biologique. Le corps produit déjà des protéines pouvant être utilisées dans le domaine pharmaceutique qui sont tolérées par l'organisme diminuant ainsi la réponse immunitaire. Les peptides et les protéines peuvent être une méthode alternative à

la thérapie génique. De plus, le développement et l'approbation de la FDA est plus rapide que pour les petites molécules médicamenteuses⁵.

Des chercheurs ont suggéré une classification des protéines et des peptides thérapeutiques, regroupés en quatre classes selon leur action pharmacologique⁵. Le groupe I représente les protéines qui jouent un rôle d'enzyme ou de régulateur de l'activité biologique. Il y a trois sous-classes :

- Les protéines qui remplacent une protéine déficiente ou anormale.
- Les protéines qui augmentent une voie métabolique existante.
- Les protéines qui fournissent une nouvelle fonction ou activité.

La deuxième classe regroupe les protéines ayant une activité cible spécifique. On retrouve deux sous-classes :

- Les protéines interférant avec une molécule ou un organisme.
- Les protéines libérant d'autres composés ou protéines.

La troisième classe concerne les vaccins et comprend trois sous-classes :

- Les protéines qui protègent contre des agents délétères ou exogènes.
- Les protéines qui permettent de traiter une maladie auto-immune.
- Les protéines qui permettent de traiter le cancer.

Le quatrième groupe n'est pas un traitement direct par des protéines thérapeutiques. Il concerne les protéines pouvant être utilisées pour établir un diagnostic. Les protéines et les peptides de ce groupe ne sont pas très développés.

De nombreux paramètres sont à prendre en compte pour la production de protéines et de peptides thérapeutiques comme par exemple la solubilité, le mode d'administration, le mode de distribution dans l'organisme et la stabilité. Les propriétés hydrophiles et hydrophobes peuvent poser des problèmes d'interactions avec les membranes, les cellules ou les récepteurs dans l'organisme⁶. La réponse immunitaire est aussi un facteur important. En effet, le système immunitaire peut détecter de petites différences dans la structure tridimensionnelle entre une protéine native synthétisée par l'organisme et une molécule introduite. Trois réponses sont alors possibles : une allergie, un choc anaphylactique, et une réponse immunitaire pouvant diminuer l'efficacité du peptide. Un défaut du système immunitaire

chez un patient peut créer une intolérance du système immunitaire⁷. Une protéine synthétique augmente la quantité d'antigènes et la quantité administrée ou la fréquence d'administration peuvent aussi créer une réponse immunitaire⁸.

Plusieurs modes de production des protéines et des peptides existent comme la production avec des bactéries, la culture cellulaire, la synthèse organique, les animaux transgéniques. Le mode de production est choisi en fonction des caractéristiques comme son mode de dégradation, mais aussi du coût de production.

1.2 Les peptides fluorés

Le développement de nouveaux acides aminés non naturels a rendu possible la synthèse de nouveaux peptides résistant mieux aux protéases. Au tournant des années 1990, le fluor a été introduit dans des molécules biologiques comme les sucres et les peptides^{9,10}. Cette avancée a permis de modifier les propriétés des peptides et d'étudier leur structure et leur fonction¹¹. Le groupe de la Pre Kokschi a analysé les modifications qu'induit l'incorporation d'atomes de fluor à des peptides modèles en vue d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques et physicochimiques¹². Des peptides ont été synthétisés en y incorporant des acides aminés contenant des groupements α -trifluorométhyle (α -Tfm). Ces études se basent sur l'augmentation de la lipophilie des peptides; des groupes de recherche incorporaient des acides aminés non naturels très lipophiles dans des peptides bioactifs afin d'améliorer leur stabilité protéolytique, leur vitesse de transport ainsi que leur capacité à perméabiliser des membranes. La Pre Kokschi décrit le groupement CF_3 comme l'un des substituants les plus lipophiles : le fluor est l'atome le plus électro-négatif du tableau périodique et exerce donc un effet de polarisation sur les acides aminés voisins. Cette polarisation permet de diminuer le caractère électrophile des peptides et donc de diminuer la dégradation de ces derniers par les protéases. Les peptides contenant des acides aminés fluorés sont de bons candidats pour être utilisés comme drogues dans le domaine pharmacologique en raison de leur grande stabilité métabolique¹³.

Le groupe de la Pre Kokschi a investigué en particulier l'utilisation de peptides modèles en substituant des acides aminés par des résidus α -Tfm. Ces peptides ont été comparés à des

peptides modèles en présence d' α -chymotrypsine, une enzyme de la famille des protéases à la sérine¹². Les études sur les peptides fluorés ont mis en évidence que la position de l'acide aminé fluoré, ainsi que sa configuration, ont une influence sur la stabilité protéolytique, c'est-à-dire que deux diastéréoisomères n'ont pas la même stabilité protéolytique.^{12,14}

Le fluor possède une liaison C-F plus stable (485 kJ/mol) que la liaison C-H (413 kJ/mol). De plus, la taille de l'atome de fluor est de 1,35 Å, ce qui est proche de l'hydrogène (1,2 Å)¹⁵. Le fluor constitue aussi une bonne sonde pour l'étude de systèmes biologiques par résonance magnétique nucléaire (RMN) du fluor^{16,17}. Dans le domaine pharmaceutique, 20 à 25 % des médicaments contiennent au moins un atome de fluor¹⁸.

1.3 L'inspiration du peptide LX2

Les peptides naturels peuvent jouer plusieurs rôles dans les cellules. On trouve des peptides hormonaux, des neuropeptides, des peptides activateurs de molécules et aussi des canaux ioniques¹⁹. Certains peptides peuvent être sous une forme acétylée dans le corps humain. L'acétylation a lieu grâce aux acétyl transférase et consiste en l'ajout d'un groupement COCH₃ au niveau du N-terminal des peptides.

En s'inspirant des récepteurs à l'acétylcholine, le Pr DeGrado et son équipe ont synthétisé et caractérisé le peptide LS2 composé de 15 résidus L-leucine et six résidus L-sérine H-(LSLLLSL)₃-OH. La L-leucine et la L-sérine ont toutes deux une propension à induire la conformation d'hélice- α lorsqu'incorporées dans une structure peptidique. En sus, leur incorporation aux positions 2, 6, 3, 13, 16 et 20 permet la formation d'une hélice- α amphiphile avec les sérines alignées du même côté de l'hélice (Figure 1.1).

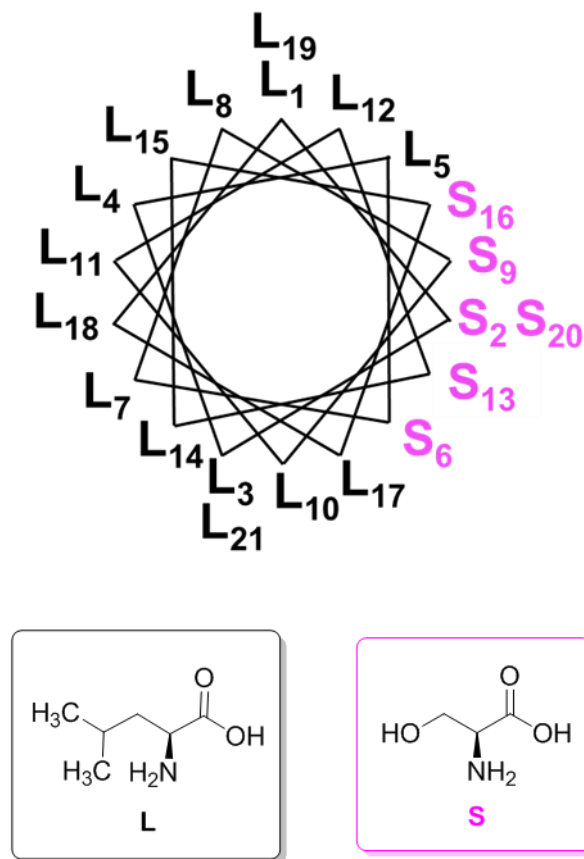


Figure 1.1. Projection (en mode roue axiale) de l'hélice- α du peptide LS2 et des acides aminés (L : leucine et S : sérine)

Sous la conformation d'hélice- α , la taille du peptide (21 acides aminés) lui permet de traverser une bicouche membranaire de POPC comme il a été montré par simulation informatique. De plus, son caractère amphiphile permet la formation d'oligomères²⁰, particulièrement en un tétramère (Figure 1.2) avec les côtés hydrophiles au centre. Celui-ci formerait un canal ionique sélectif aux protons²¹.

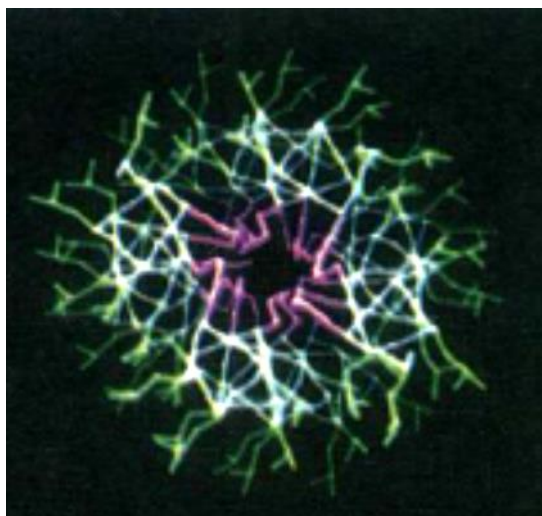


Figure 1.2. Représentation du tétramère du peptide LS2 (rose : sérine, vert : leucine et blanc : liaison peptidique)²¹

Le peptide LX2 s'inspire du peptide modèle LS2, les sérines étant remplacées par des acides 2-amino-4,4,4-trifluorobutyriques. Le remplacement par des acides aminés fluorés permet de conserver l'amphiphilicité de la molécule, avec cette fois une face fluorée et une hydrophobe, et de diminuer le clivage du peptide. Cette conservation des propriétés du peptide LS2 chez LX2 nous amène à penser que ce dernier va se comporter de façon assez similaire lorsqu'inséré dans une membrane. On suppose que les acides aminés fluorés seront alignés le long de l'hélice favorisant la formation d'oligomères. De plus, la présence de ces acides aminés peut entraîner une modification du diamètre du pore interne des structures oligomériques, permettant un meilleur passage des ions à travers le canal. Toutes ces propriétés vont être bénéfiques pour créer un peptide à potentiel thérapeutique pouvant être utilisé comme agent nanochimiothérapeutique particulièrement robuste. De plus, les propriétés du LX2 pourraient amener à synthétiser d'autres peptides fluorés pouvant être utilisés comme agents nanochimiothérapeutiques.

Deux peptides LX2 ont été synthétisés et caractérisés au cours de ce projet, le peptide original et sa version acétylée en N-terminal (Figure 1.3). L'acétylation permet d'enlever une charge positive pouvant amener des modifications de conformation ou des interactions différentes entre les peptides et les membranes.

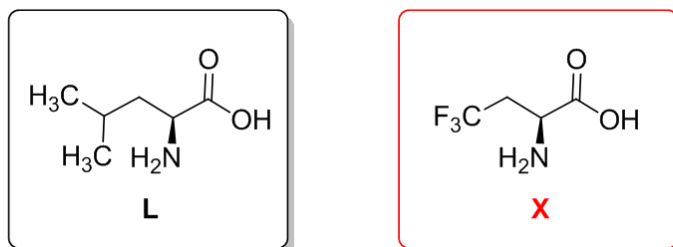


Figure 1.3. Séquence des peptides LX2 et LX2 acétylé (LX2-Ac) avec la représentation des acides aminés leucine (L) et 2-amino-4,4,4-trifluorobutyrique (X)

1.4 Travaux antérieurs sur LX2

1.4.1 Synthèse peptidique

La synthèse des peptides LX2 et LX2 acétylé (LX2-Ac) a été mise au point dans l'équipe du Pr Normand Voyer en utilisant la méthode de synthèse sur support solide grâce à une résine de Wang en utilisant des acides aminés protégés par le groupe fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc)²⁰.

1.4.2 Travaux de modélisation

Des travaux de modélisation du peptide LX2 ont été effectués par le groupe du Pr Patrick Lagüe. Ces travaux prédisent une structure en hélice- α du LX2 avec les acides aminés fluorés alignés du même côté de l'hélice, comme pour le peptide LS2 (Figure 1.4).

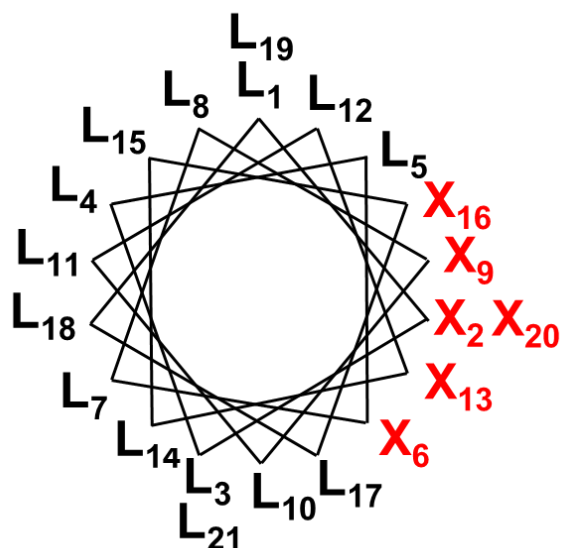


Figure 1.4. Projection (en mode roue axiale) de l'hélice- α du peptide LX2

Ensuite, les travaux de modélisation prédisent la formation d'oligomères en milieu de faible polarité comme une membrane lipidique. La structure en tétramère avec un diamètre interne de 3,7 Å serait la plus stable comparée à celle en trimère ou pentamère²⁰ (Figure 1.5).

Tétramère
Diamètre interne 3,7 Å

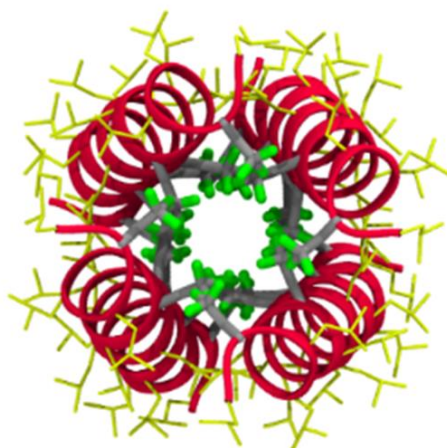
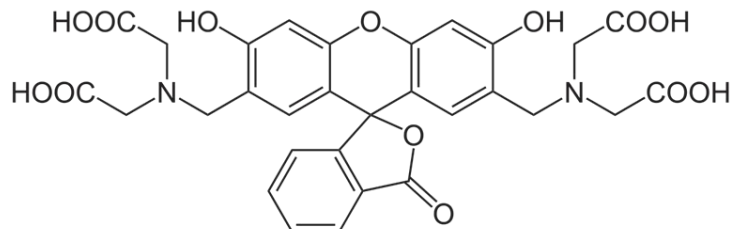


Figure 1.5. Représentation du tétramère formé par le LX2 telle que calculée par modélisation²⁰

1.4.3 Formation d'un canal ionique

L'auto-assemblage de peptides amphiphiles peut former des pores à travers la membrane ou s'insérer de façon spécifique afin de former un canal ionique. Les pores sont des perturbations non spécifiques qui perforent la membrane tandis que les canaux sont des structures organisées transmembranaires. Des études de relargage de la calcéine ont été réalisées dans le groupe du Pr Voyer pour démontrer la formation d'un canal ionique par le LX2, et non de pores, à travers les membranes. Pour cela, on utilise la calcéine (Figure 1.6), un fluorophore de haut poids moléculaire qui fluoresce peu à forte concentration.



Calcéine (diamètre $\approx 10 \text{ \AA}$)

Figure 1.6. Molécule de calcéine

Donc, encapsulée dans des membranes lipidiques, la calcéine fluoresce peu. Mais, lorsqu'il y a formation de pores suffisamment large à travers la membrane elle est libérée, sa concentration diminue et sa fluorescence augmente (Figure 1.7).

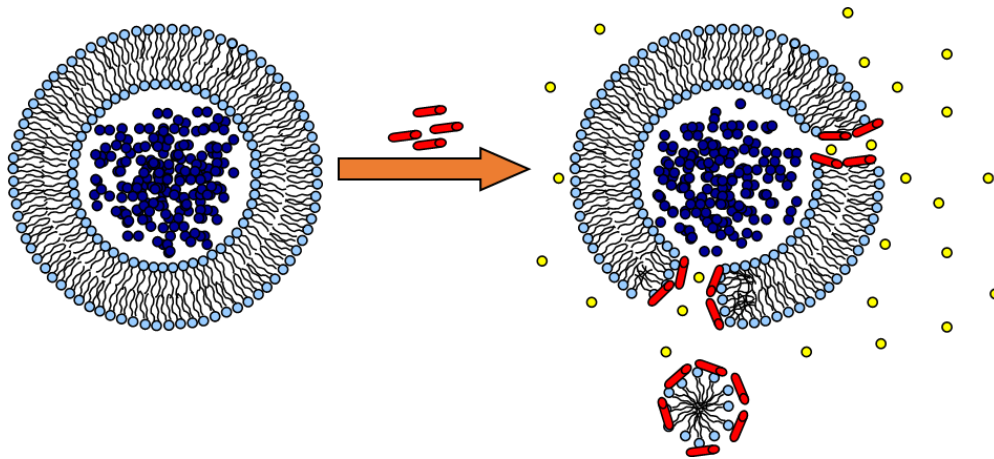


Figure 1.7. Schéma de la formation de pores membranaires et de libération de la calcéine

Lors d'études avec LX2, il n'y a pas eu d'augmentation de fluorescence, c'est-à-dire que le peptide n'a pas formé de pores au sein de la membrane. On peut donc supposer qu'il forme un canal ionique, mais pour en savoir plus, il est nécessaire d'étudier le passage éventuel à travers la membrane de petites molécules comme des ions.

Des études de transport d'ions ont donc été effectuées afin de vérifier que le peptide LX2 forme un canal ionique permettant le passage d'ions de part et d'autre de la membrane. Ces études ont été réalisées pour les ions Na^+ , K^+ et Cs^{+20} .

Comme le montre la Figure 1.8, la plus grande sélectivité ionique a été observée pour l'ion sodium qui a le plus faible diamètre (0,95 Å). La moins bonne sélectivité a été observée pour l'ion césium qui a le diamètre le plus élevé (1,69 Å).

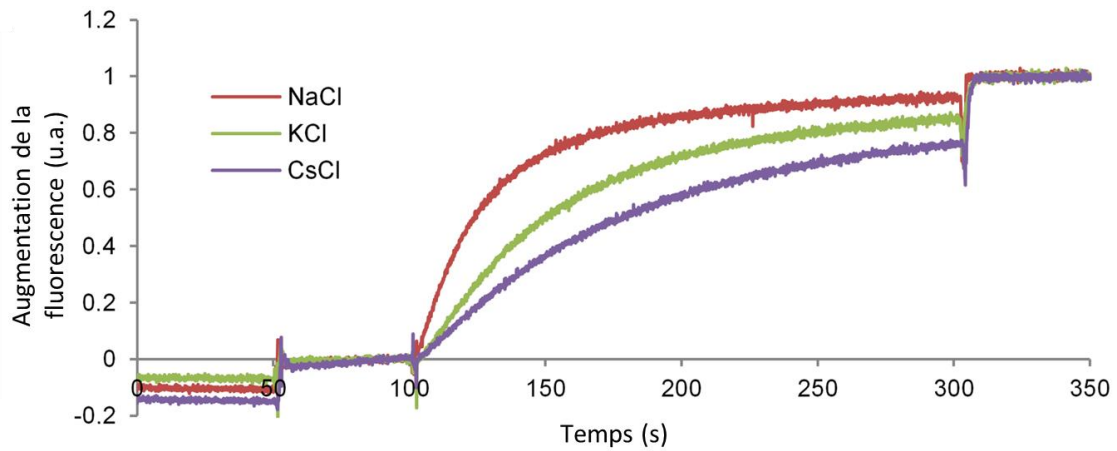


Figure 1.8. Courbes de transport ionique à travers des membranes phospholipidiques modèles pour les ions sodium, le potassium et le césium²⁰

Une étude comparative a permis de constater que le peptide LX2 avait une meilleure efficacité de transport des ions Na⁺ que le peptide LS2. Cela peut être dû au diamètre des canaux ioniques. En effet, le diamètre du tétramère du LS2 est inférieur à 1 Å²¹.

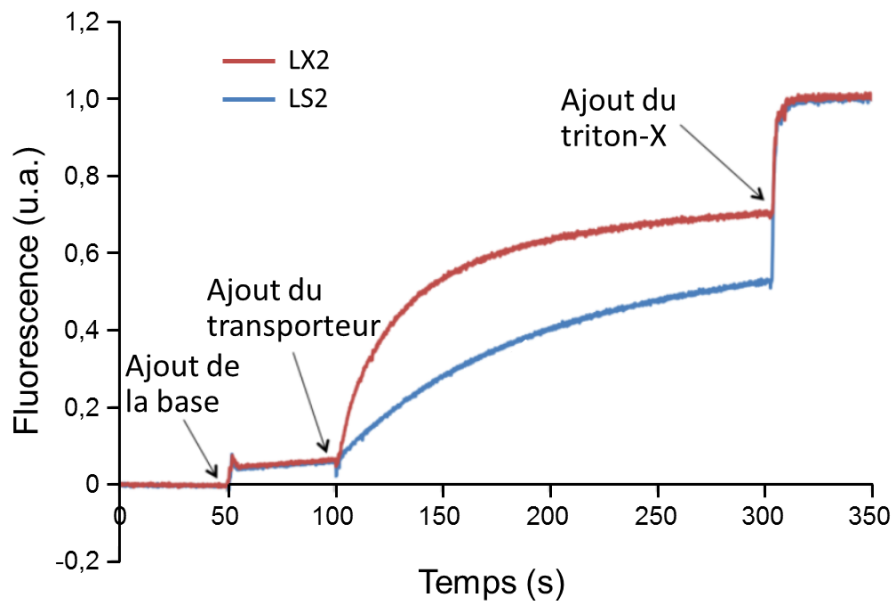


Figure 1.9. Comparaison de l'efficacité de transport des ions sodium pour les peptides LS2 et LX2

1.5 Objectifs

L'absence de libération de la calcéine et le transport d'ions suggèrent que le peptide LX2 forme des canaux au sein de membranes lipidiques tandis que les travaux de simulations suggèrent la formation de tétramères dans lesquels les atomes de fluor de chaque hélice se font face et stabilisent l'assemblage peptidique²⁰. Cependant, des preuves ou des indices expérimentaux et structuraux de l'insertion du peptide au sein de membranes lipidiques, la formation d'un canal et de la formation d'une structure en tétramère sont manquantes.

Ce mémoire porte donc sur la caractérisation biophysique de la structure des peptides LX2 et LX2-Ac dans un contexte membranaire. Le but du projet est d'étudier les interactions entre ces deux peptides fluorés et des modèles de membranes cellulaires, de vérifier que le LX2 adopte une structure en hélice- α dans les membranes et qu'il s'assemble en tétramère, dans l'optique d'une utilisation comme canal ionique artificiel transmembranaire.

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs techniques ont été utilisées. Tout d'abord, le dichroïsme circulaire a permis de déterminer la structure secondaire et la stabilité thermique des peptides en solution et dans des membranes. La spectroscopie infrarouge a ensuite permis de confirmer cette conformation avec l'analyse de la bande amide I' et de déterminer l'influence des peptides sur les phospholipides en observant les bandes d'élongation des groupements CH₂ et carbonyle. La spectroscopie RMN du phosphore a permis d'étudier la dynamique des têtes polaires des lipides tandis que celle du deutérium d'étudier la dynamique des chaînes acyle. La spectroscopie RMN du fluor-19 a permis d'obtenir des informations sur l'insertion des peptides dans les membranes. Enfin la technique du CODEX en RMN du fluor-19 et du carbone-13 a été utilisée afin de tenter de déterminer le degré d'oligomérisation des peptides.

Pour ces études, un modèle membranaire a été choisi en se basant sur la composition des membranes des cellules eucaryotes. Celles-ci ont une composition complexe, elles possèdent une grande variété de lipides différents ainsi que des protéines, des glucides, et du cholestérol (Figure 1.10).

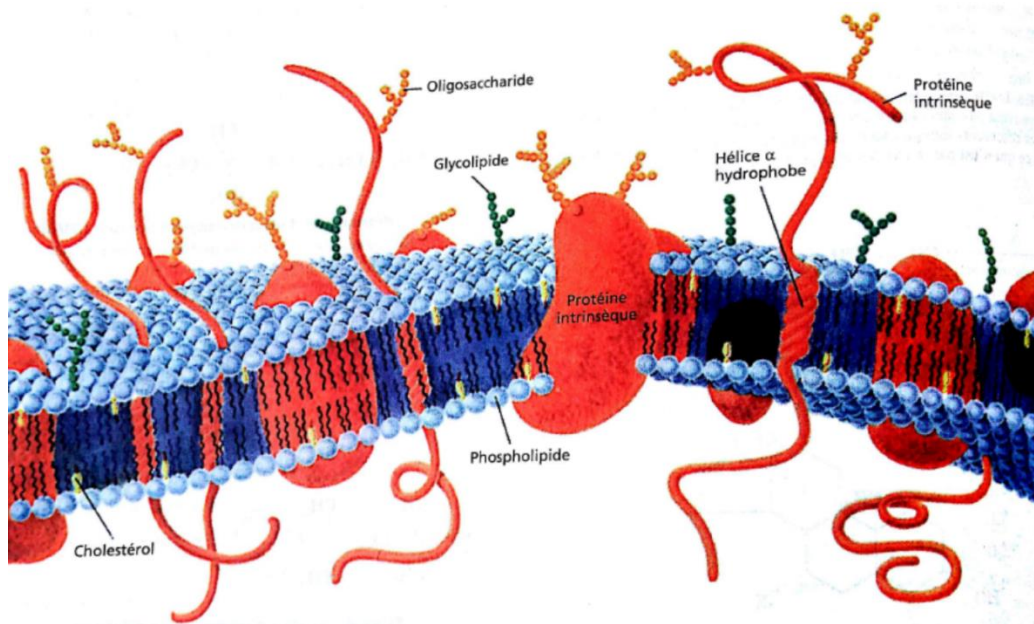


Figure 1.10. Schéma d'une membrane de cellule eucaryote ²²

Il est donc nécessaire de simplifier ce système. Dans les membranes eucaryotes, les phosphatidylcholines sont les lipides qui sont présents en plus grande quantité (à 19%) et on retrouve 25% de cholestérol (Tableau 1.1)²³.

Type de phospholipide	Proportion (%)
Acide phosphatidique	1,5
Phosphatidylcholine	19
Phosphatidyléthanolamine	18
Phosphatidylsérine	8,5
Sphingomyéline	17,5
Glycolipides	10
Cholestérol	25

Tableau 1.1. Composition lipidique moyenne des cellules eucaryotes

Le modèle utilisé est donc un mélange de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (POPC) et de cholestérol (Figure 1.11), qui est considéré comme un bon modèle de cellule eucaryote²⁴. Le rapport molaire choisi est POPC:cholestérol 80:20.

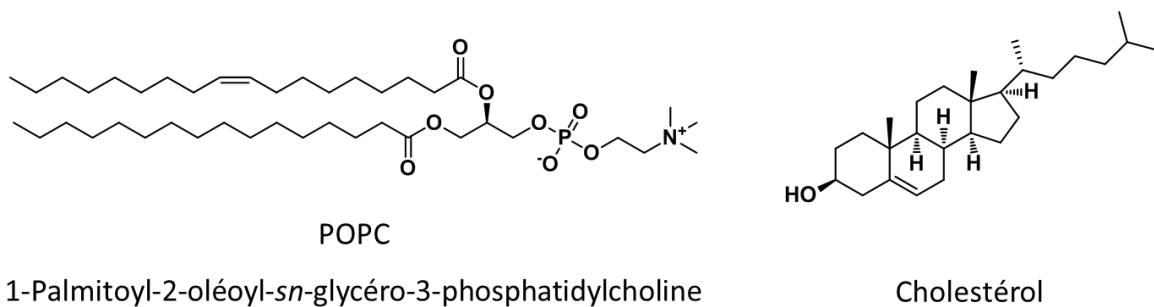


Figure 1.11. Structure de la POPC et du cholestérol

Chapitre 2 : Partie expérimentale

2.1 Synthèse peptidique

La résine de Wang, l'acide aminé Fmoc-L-Leucine, ainsi que les réactifs de couplage ont été obtenus de Matrix Innovation (Québec, QC, Canada). L'acide 2-amino-4,4,4-trifluorobutyrique a été obtenu de Polypeptide Group (San Diego, CA, USA). La L-Leucine marquée au ^{13}C a été achetée chez Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA) et a été protégée au laboratoire à l'aide du Fmoc-OSu. La synthèse peptidique sur support solide utilisant la résine de Wang a été utilisée. Les acides aminés possèdent un groupement protecteur fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc). La procédure habituelle de synthèse peptidique en phase solide a été utilisée.

Le premier acide aminé, la Fmoc-L-Leucine, est déjà greffée à la résine commerciale. Pour le couplage des acides aminés suivants, la résine (180 mg, 0,064 mmol) est d'abord gonflée 2 fois avec du *N,N*-diméthylformamide (DMF). Le groupement Fmoc est par la suite déprotégé avec une solution pipéridine/DMF 20/80 (4 mL) ajoutée à la résine. Le mélange est ensuite agité à température pièce pendant 15 minutes, puis la résine est lavée 3× successivement au DMF, 3× au méthanol (MeOH) puis de nouveau 3× au DMF. Cette étape de déprotection doit être répétée deux fois. Afin d'activer l'acide aminé avant le couplage, la Fmoc-L-Leucine (56,2 mg, 0,159 mmol), l'hexafluorophosphate de *O*-(6-chlorobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium (HCTU) (65,8 mg, 0,159 mmol) et le 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (6Cl-HOBt) (27 mg, 0,159 mmol) sont préalablement dissous ensemble dans le DMF, puis la *N*-méthylmorpholine (35 μL , 0,318 mmol) est ajoutée. Cette solution est ensuite ajoutée à la résine et agitée mécaniquement pendant 1 h à température ambiante. Dans le cas du couplage de l'acide aminé fluoré, soit l'acide Fmoc-2-amino-4,4,4-trifluorobutyrique, l'hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N,N*-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-yloxy)méthaniminium (HATU) est utilisé plutôt que le HCTU. Le test de Keiser est effectué après chaque couplage afin de vérifier que celui-ci a bien fonctionné. Ce test est fiable à 98 % et réagit en présence d'amine libre.

Une fois les étapes de couplages terminées, le tiers de la résine est récupéré afin d'être acétylé. L'acide aminé est déprotégé avec la méthode décrite précédemment. Après les lavages, une solution de 50:50 anhydride acétique:DCM et 5 équivalents de NMM (50 μ L) est ajoutée à la résine et mélangée 1 h à température pièce. Les lavages ont ensuite été faits en terminant avec le MeOH.

Une fois les couplages terminés, le clivage de la résine se fait en milieu acide avec une solution 95:5 acide trifluoroacétique (TFA):H₂O et le mélange est agité 2 h à température ambiante. Le peptide est récupéré et trituré trois fois dans l'éther puis lyophilisé dans l'acide acétique glacial. La caractérisation est faite avec un spectromètre de masse MALDI-TOF.

Pour le peptide avec une L-leucine marquée au ¹³C sur le carbonyle (L-Leucine (1-¹³C)), l'acide aminé est acheté non protégé au niveau du N-terminal. Il a donc été nécessaire de le protéger avec un groupement Fmoc. Pour cette réaction, la L-Leucine (1-¹³C) (328 mg, 2,5 mmol) a d'abord été dissoute dans 25 mL d'eau distillée et 2,5 mL d'une solution de NaOH 1 N a été ajoutée. Le Fmoc-OSu (810 mg, 2,4 mmol) est dissout dans 25 mL d'acétonitrile. Les deux solutions ont été mélangées et le pH ajusté à 8,5-9 avec une solution de NaOH 1 N. Le mélange réactionnel a été agité 1 h 30 à température ambiante, puis le solvant a été évaporé. Une solution de HCl 1,5 N a été ajoutée au résidu réactionnel et le produit a été extrait 2× au dichlorométhane (CH₂Cl₂). Les phases organiques combinées ont été ensuite lavées 3× avec de l'eau distillée, séchées au MgSO₄, puis évaporées sous pression réduite.

2.2 Matériel et méthodes

Les lipides 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (POPC), la POPC avec la chaîne palmitoyle perdeutérées (POPC-d₃₁) ainsi que le cholestérol ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Le phosphate de sodium dibasique anhydre (Na₂HPO₄), le phosphate de sodium monobasique anhydre (NaH₂PO₄), l'eau deutérée, l'eau « depleted » (voir la section RMN des solides), l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonic (HEPES) et

l'hexafluoroisopropanol (HFIP) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'eau utilisée est distillée et déionisée avec un système Barnstead NANOpur II (Boston, MA, USA).

2.2.1 Dichroïsme circulaire

Pour les analyses en solution, 0,6 mg de peptide ont été dissouts dans 2,0 mL de HFIP. Pour les études avec des membranes modèles, des vésicules unilamellaires ont été préparées avec 53,2 μL de POPC (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du chloroforme) qui est co-solubilisée avec 67,7 μL de cholestérol (0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du chloroforme) afin d'obtenir un rapport molaire POPC:cholestérol 80:20 puis le peptide (LX2 ou LX2-Ac) en solution dans le HFIP est ajouté à la concentration souhaitée selon le rapport molaire peptide:lipide désiré. Le mélange a ensuite été séché sous flux d'azote puis placé sous vide afin d'enlever toutes traces de solvant organique. La préparation est hydratée avec un tampon phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ajusté à $\text{pH} = 7$ avec du NaOH. Les échantillons sont vortexés et soumis à dix cycles de gel dans l'azote liquide et de dégel à 37 °C. Pour obtenir des vésicules unilamellaires, les échantillons sont soniqués pendant 1 h 30 avec un sonicateur Liposonicator de chez Avanti Polar Lipids. Les spectres CD sont enregistrés avec un spectrophotomètre Jasco J-715 et une cellule de quartz de 0,1 cm. Chaque spectre est réalisé avec 20 balayages et est normalisé en ellipticité molaire après soustraction des spectres des lipides sans peptide en utilisant la formule ci-dessous :

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \times c \times l} \quad \text{Équation 2.1}$$

$[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) : ellipticité molaire

θ (mdeg) : signal obtenu

c ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) : concentration molaire en peptide

l (cm) : parcours optique de la cellule

$$c = \frac{1000 \times n \times C_{\text{pep}}^m}{M_p} \quad \text{Équation 2.2}$$

c (mol.L⁻¹) : concentration molaire en peptide

n : nombre de résidus

C^m_{pep} (g.ml⁻¹) : concentration massique en peptide

M_p (g.mol⁻¹) : poids moléculaire du peptide

2.2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les vésicules multilamellaires ont été préparées en co-solubilisant 88,7 µL de POPC/CHCl₃ (25 mg·mL⁻¹) et 56,4 µL de cholestérol/CHCl₃ (5 mg·mL⁻¹) afin d'obtenir un rapport molaire POPC:cholestérol 80:20. 186 µL de peptide LX2 ou 189 µL de LX2-Ac en solution à 1 mg·mL⁻¹ dans du HFIP ont ensuite été ajoutés afin d'obtenir un rapport molaire peptide:lipide de 1:50. Le mélange a ensuite été séché sous flux d'azote et lyophilisé afin d'enlever les traces de solvant organique. Le mélange a ensuite été hydraté avec 50 µL de tampon phosphate deutéré 10 mM (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) ajusté à pD = 7,4. Les échantillons sont vortexés, s'ensuivent 10 cycles de gel dans l'azote liquide et de dégel à 37 °C puis une agitation par vortex.

Les spectres IR sont obtenus avec un spectromètre Nicolet Magna 560 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) équipé avec un détecteur MCT (Mercury-Cadmium-Telluride) refroidi à l'azote liquide. Les échantillons (vésicules multilamellaires) sont déposés entre deux fenêtres de CaF₂ Biocell (BioTools, Wauconda, IL, USA) d'un parcours optique de 45 µm. Un montage à élément Peltier est utilisé pour contrôler la température à l'aide du logiciel OMNIC. Cent-vingt-huit (128) interférogrammes sont enregistrés entre 4000 et 650 cm⁻¹ pour chaque spectre. Le blanc (« background ») est réalisé à vide. Les gradients de température sont faits entre 20 et 80 °C en enregistrant un spectre tous les 5 °C ainsi qu'un spectre à 37 °C.

Les spectres sont traités avec le logiciel Grams (Thermo Fisher Scientific Inc.). Pour les bandes d'élongation des groupements CH₂, les spectres sont traités entre 3070 et 2760 cm⁻¹. Une ligne de base avec une fonction quadratique est tracée pour chaque spectre.

Pour les spectres de la bande d'élongation des groupements carbonyle et de la bande amide I', les spectres sont traités entre 1850 et 1500 cm^{-1} . Dans un premier temps le spectre du tampon à chaque température spécifique est soustrait des spectres bruts. Les lignes de bases sont tracées avec une fonction quadratique, puis une soustraction du spectre de vapeur d'eau est réalisée.

Les courbes de thermotropisme des lipides sont obtenues avec un programme développé au laboratoire nommé Cegra qui calcule le barycentre de l'aire constituée par les 90 % supérieur de la bande étudiée. Pour les vibrations d'élongation des CH_2 , on se focalise sur la bande à $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$.

2.2.3 Spectroscopie RMN des solides

Pour les études en RMN des solides; 1,116 mg poudre de LX2 ou 1,135 mg de LX2-Ac ont d'abord été pesés puis co-solubilisés avec 372,3 μL de POPC (25 mg/mL dans du chloroforme), 160 μL de POPC- d_{31} (25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du chloroforme) et 169 μL de cholestérol (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du chloroforme). Le mélange est séché sous flux d'azote et mis sous vide afin d'évaporer les traces de solvant. Un volume de 80 μL de tampon 10 mM HEPES et 0,5 mM EDTA dans de l'eau « depleted » (cette eau est appauvrie en deutérium afin de n'obtenir qu'un signal des lipides en RMN ^2H) est utilisée. Ensuite, 10 cycles de gel dans l'azote liquide et de dégel à 37 $^\circ\text{C}$ sont faits afin d'hydrater les vésicules multilamellaires.

Les échantillons sont placés dans un tube en céramique de 4 mm, avec un espaceur CRAMP BL4 PE acheté chez CortecNet (Voisins-Le-Bretonneux, France). L'appareil utilisé est un spectromètre Bruker Avance 400 MHz avec une sonde HFX/MAS de 4 mm.

Les spectres protons découplés en RMN solide en mode statique du ^{31}P ont été obtenus à une fréquence de 161,97 MHz avec une séquence d'écho de Hahn²⁵ et un découplage des protons two-pulse phase modulation (TPPM)²⁶. Des spectres de 3000 balayages ont été enregistrés

avec 4096 points de mesure, une impulsion de 4,1 μ s, un temps de recyclage de 4 s, un temps inter-impulsions de 60 μ s et une largeur spectrale de 50 kHz. Les analyses ont été réalisées à 37°C. Une multiplication exponentielle de 150 Hz a été appliquée à tous les spectres. La référence utilisée est un échantillon de 85 % de H₃PO₄ calibré à 0 ppm.

Les spectres en RMN solide en mode statique du ²H ont été obtenus à une fréquence de 61,42 MHz avec une séquence d'écho quadrupolaire²⁷. Des spectres de 7000 balayages ont été enregistrés avec 16384 points de mesure, une impulsion de 4,5 μ s, un temps de recyclage de 50 ms, un temps inter-impulsions de 60 μ s et une largeur spectrale de 500 kHz. Les analyses ont été réalisées à 37 °C.

Les spectres en RMN solide en mode statique du ¹⁹F ont été obtenus à une fréquence de 376,46 MHz avec un puissant découplage des protons. Des spectres de 1000 balayages ont été enregistrés avec 2048 points de mesure, une impulsion de 3,325 μ s, un temps de recyclage de 2 s et une largeur spectrale de 56,5 kHz. Les analyses ont été réalisées à 37°C. Une multiplication exponentielle de 50 Hz a été appliquée sur tous les spectres. Les analyses ont été réalisées à 37 °C. La référence utilisée est un échantillon de TFA calibré à -76,55 ppm. Pour les spectres de rotation à l'angle magique l'échantillon a été soumis à une rotation de 5000 Hz.

Les spectres en RMN solide en mode statique du ¹³C ont été obtenus à une fréquence de 100,62 MHz avec un découplage des protons. Des spectres de 10000 balayages ont été enregistrés avec 2048 points de mesure, une impulsion de 5,5 μ s, un temps de recyclage de 4 s et une largeur spectrale de 25 kHz. Les analyses ont été réalisées à 37°C. Une correction de ligne de base de 50 Hz a été appliquée sur tous les spectres. Les analyses ont été réalisées à 37 °C.

Pour la technique RMN du CODEX (centerband-only detection of exchange). La vitesse de rotation à l'angle magique est de 6500 Hz, le temps de mélange varie de 0,76 ms à 157,69 ms en fonction du nombre de périodes de rotor qui a varié de 4 à 1024. Le D1 est de 1,5 s. Les protons ont été découplés. La longueur d'impulsion à 90° est de 3,37 μ s et la longueur

d'impulsion à 180° est de $6,74 \mu\text{s}$. Les analyses avec la séquence CODEX sont faites à -50°C en ^{19}F et -40°C en ^{13}C . Les spectres sont traités avec le logiciel MNova.

Chapitre 3 : Caractérisation des peptides LX2 et LX2 acétylé

Afin de vérifier que la synthèse peptidique a été correctement complétée, on utilise la spectrométrie de masse d'ionisation au laser assistée par matrice (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) avec un analyseur à temps de vol (*time of flight*, TOF). Le peptide LX2 étant très hydrophobe et peu soluble dans les solvants conventionnels, la caractérisation se fait avec une méthode utilisant un échantillon solide. De plus, le MALDI-TOF est une méthode qui fonctionne bien pour les peptides²⁸. Le détecteur à la sortie de l'analyseur émet un signal plus intense lorsque la molécule arrive avec une vitesse élevée. Plus le peptide a une masse élevée, plus sa vitesse diminue dans l'analyseur, donc moins l'impact sur le détecteur est élevé. Cela amène donc un signal moins intense. Le LX2 étant un peptide de seulement 21 acides aminés, la méthode MALDI est parfaitement appropriée²⁹.

3.1 Principe

Le spectromètre de masse est composé de trois parties importantes : la source, l'analyseur et le détecteur.

3.1.1 La source MALDI

La spectrométrie de masse MALDI-TOF utilise une source dans laquelle un échantillon est mélangé à une matrice et placé dans un vide poussé. Il y a deux étapes, soit la désorption de l'échantillon puis l'ionisation. La matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque³⁰. La matrice permet d'ioniser l'échantillon lorsque celui-ci est irradié par un faisceau ultra-violet. L'échantillon est alors envoyé dans l'analyseur.

3.1.2 L'analyseur TOF

L'échantillon ionisé est soumis à un champ électrique dans le tube de l'analyseur. Le temps parcouru par les molécules depuis l'entrée de l'analyseur jusqu'au détecteur est calculé et celui-ci est proportionnel à la masse de l'analyte.

3.1.3 Le détecteur

Les ions frappent le détecteur et c'est cette composante qui permet d'obtenir la masse de l'échantillon analysé. Les spectres MALDI-TOF sont obtenus avec des ions monochargés.

3.2 Résultats

Le poids moléculaire attendu est de $2549,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le LX2-Ac. Le spectre nous montre la présence du peptide protonné à $2549,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, plus un ion sodium à $2573,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et plus un ion potassium $2589,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La présence d'ions sodium et potassium est due à la présence de contaminant dans la source²⁹. Ce phénomène est observé régulièrement en spectrométrie de masse MALDI avec des échantillons peptidiques.

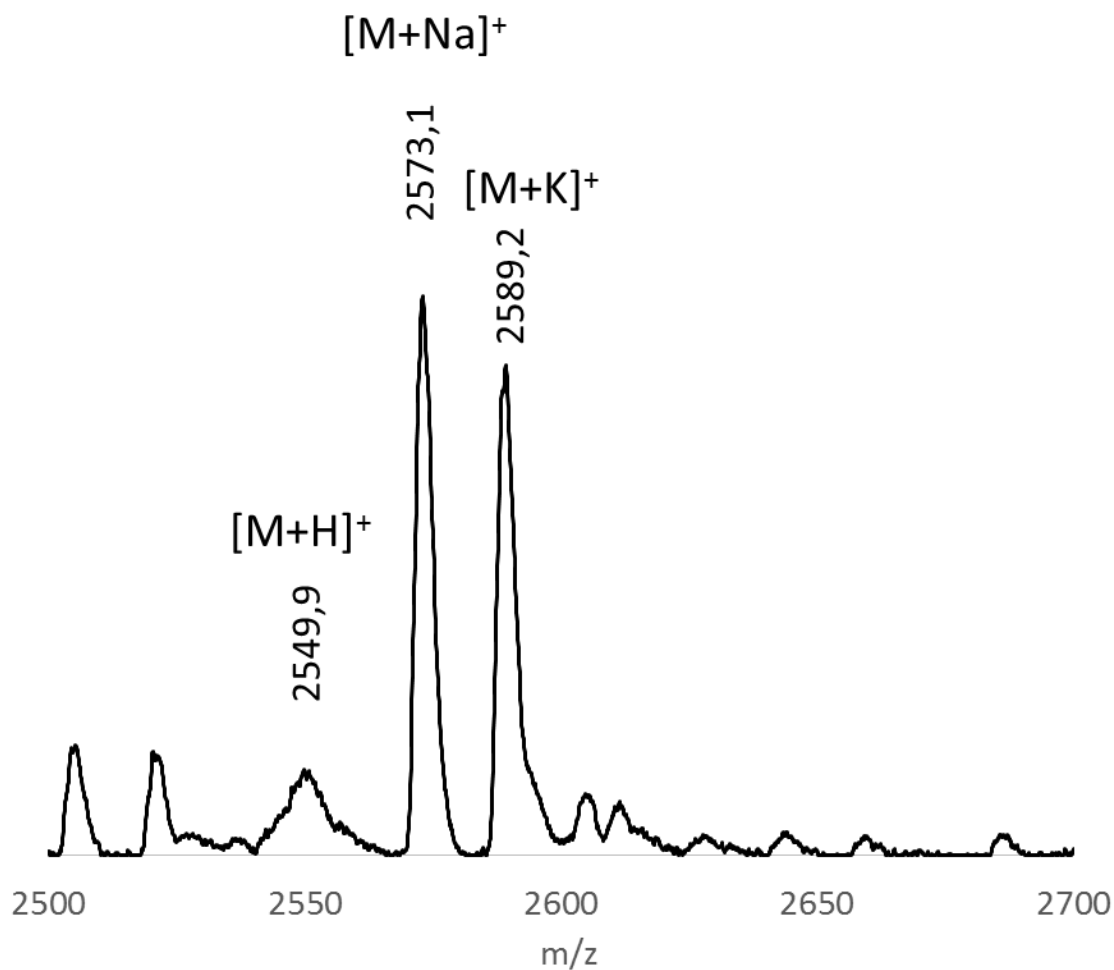


Figure 3.1. Spectre MALDI-TOF du peptide LX2

Pour le peptide acétylé, le poids moléculaire attendu est $2591,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Le spectre MALDI obtenu montre la présence du peptide plus un ion sodium à $2614,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et plus un ion potassium à $2630,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les pics à $2475,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $2546,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ne correspondent pas à des fragments manquants, et il n'a pas été possible de définir à quoi ils correspondent.

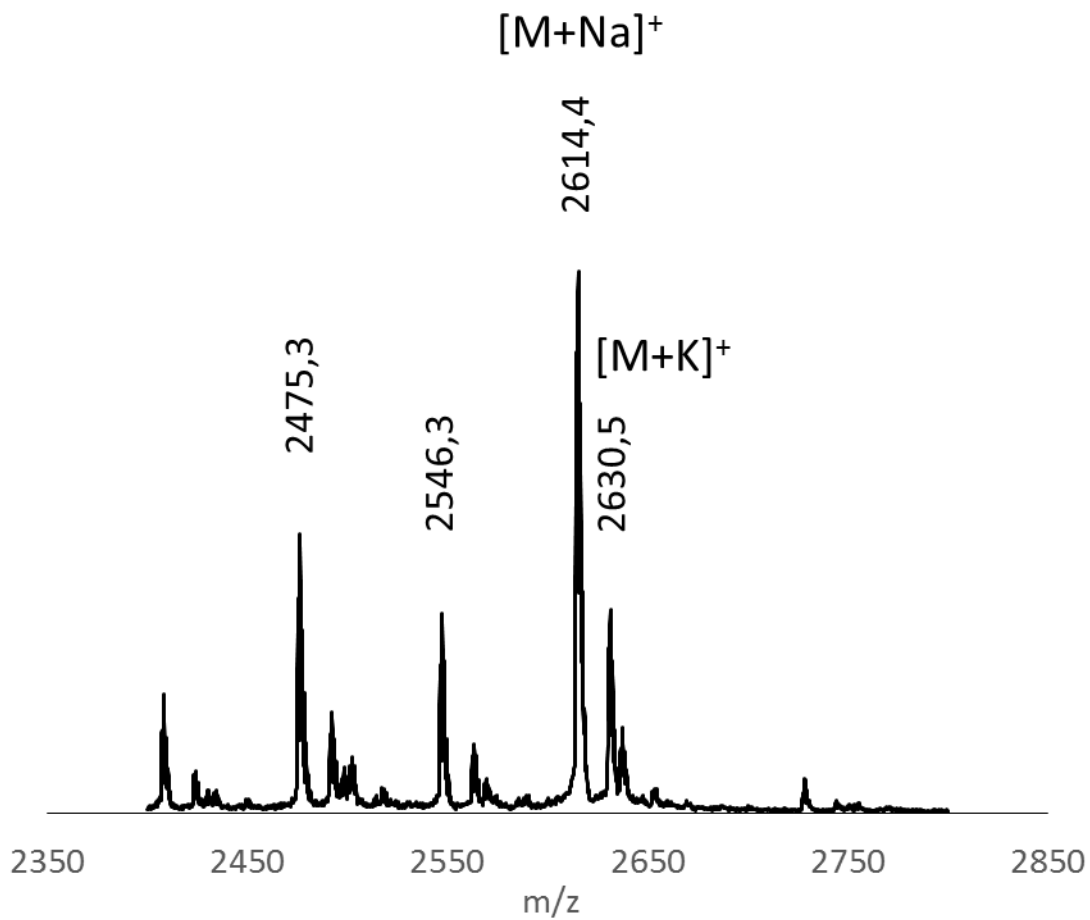


Figure 3.2. Spectre MALDI-TOF du peptide LX2-Ac.

Les résultats obtenus ont permis de constater que les deux peptides ont bien été synthétisés, cependant la pureté du peptide n'a pas été calculée en raison de la mauvaise solubilité du peptide avec les solvants conventionnels.

Chapitre 4 : Détermination de la structure secondaire des peptides LX2 et LX2 acétylé par dichroïsme circulaire

4.1 Principe du dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est une méthode basée sur l'absorption de lumière polarisée circulairement. Considérons deux ondes lumineuses de même amplitude polarisées linéairement dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation, la première polarisée verticalement, la seconde horizontalement. Si ces deux lumières sont de même amplitude et qu'elles sont en phase, la lumière qui en résulte est polarisée de manière linéaire à 45 degrés³¹. Si ces deux lumières ne sont pas en phase, elles ne sont plus polarisées de manière linéaire, mais de manière circulaire. Cette lumière peut être polarisée circulairement à droite (sens horaire) ou à gauche (sens antihoraire). Dans une expérience de CD, un faisceau polarisé est projeté sur un échantillon optiquement actif qui va absorber les deux composantes circulaires (droite et gauche) différemment permettant d'obtenir un spectre d'absorption différentielle.

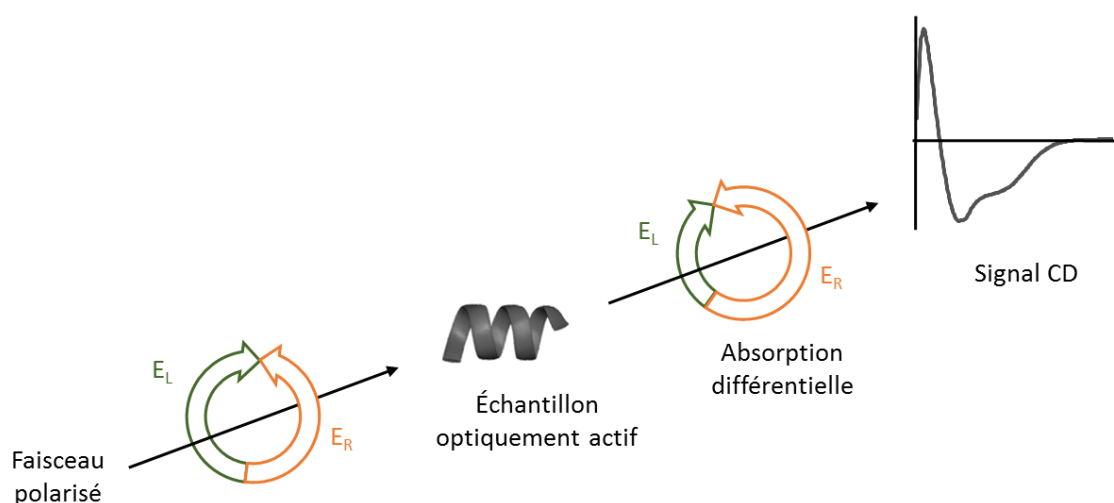


Figure 4.1. Schéma du principe de la spectroscopie CD. E_L (lumière polarisée à gauche)
 E_R (lumière polarisée à droite)

Le CD est une méthode qui permet de déterminer la structure secondaire des peptides et des protéines (Figure 4.2). C'est la région d'absorption des groupements carbonyle qui permet d'obtenir un signal. Le signal observé se situe entre 190 et 260 nm. Le signal perçu est dû aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ visibles aux alentours de 222 nm et $\pi \rightarrow \pi^*$ visibles vers 208 et 190 nm³².

L'allure des spectres nous renseigne sur la structure secondaire :

- Hélice- α : maximum à 190 nm et deux minimums à 208 et 222 nm.
- Feuillet β : maximum à 196 nm et minimum à 218 nm.
- Structure désordonnée : maximum à 212 nm et minimum à 195 nm.

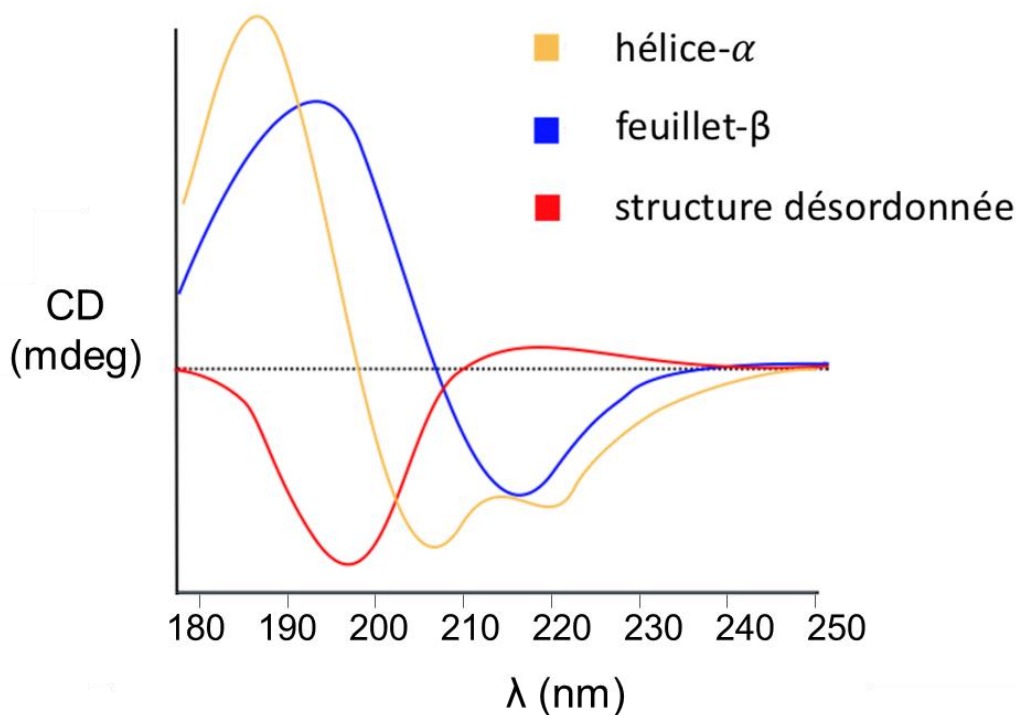


Figure 4.2. Spectres CD typiques des structures secondaires des peptides et des protéines³¹

4.2 Résultats

4.2.1 Peptides en solution

Les peptides ont d'abord été étudiés en solution. Ces peptides sont difficiles à solubiliser et ils sont solubles seulement dans le HFIP. La Figure 4.3 montre les spectres CD du LX2 et du LX2-Ac dans le solvant. Les deux peptides présentent des spectres avec des minima à 208 et 222 nm ainsi qu'un maximum à 192 nm. La bande à 208 nm est plus intense que celle à 222 nm. Ce patron suggère que le LX2-Ac est majoritairement sous forme d'hélice- α , mais en équilibre avec des structures désordonnées.

Le peptide LX2-Ac a une structure en hélice- α mieux définie comme le montre le maximum à 192 nm et les deux minima, celui à 208 nm ayant une ellipticité plus importante que celui à 220 nm. Le peptide LX2 quant à lui a un maximum à 190 nm. Si on compare les deux peptides, on peut observer des spectres très similaires qui ne diffèrent que par leur intensité, ce qui peut s'expliquer par une conformation plus importante pour LX2-Ac; celui-ci ayant une liaison hydrogène supplémentaire avec l'acétylation. Par ailleurs, il est aussi possible que ce résultat découle d'une différence de solubilité entre les deux peptides. Le LX2-Ac serait donc plus soluble dans le HFIP que le LX2³³.

La solubilité des peptides est une propriété importante. Une insolubilité des peptides peut entraîner une agrégation compliquant leur production ainsi que leur utilisation dans le domaine pharmaceutique. En effet, cela peut augmenter la réponse immunitaire⁸.

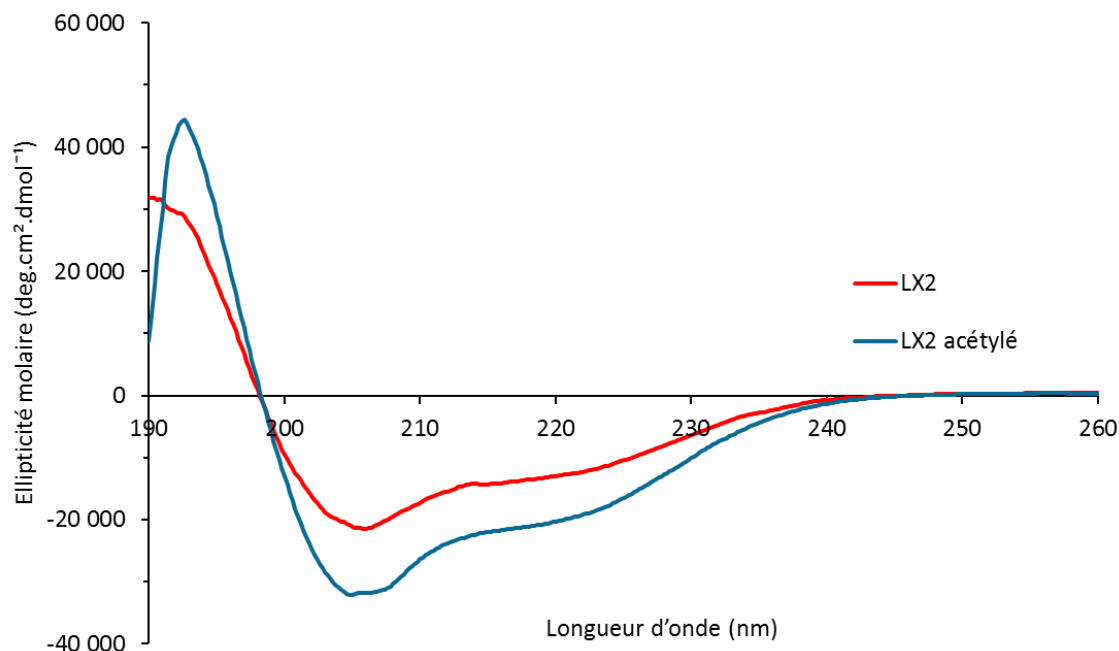


Figure 4.3. Spectres CD des peptides LX2 et LX2-Ac à 0,3 mg/mL en solution dans le HFIP

4.2.2 Peptides dans les membranes modèles

Les Figures 4.4 et 4.5 montrent les spectres CD des peptides LX2 et LX2-Ac dans des membranes qui miment les cellules eucaryotes (POPC-cholestérol) ainsi que dans des membranes composées seulement de POPC. Les spectres sont différents de ceux observés dans le HFIP. Ici on observe deux minima à 208 et 222 nm d'égales intensités qui montrent que les peptides dans les membranes ont une structure secondaire majoritairement en hélice- α .

Comme le montre la Figure 4.4, les spectres sont identiques en présence et en absence de cholestérol. Cette observation suggère que le LX2 n'est pas influencé par la présence de cholestérol dans les vésicules de POPC.

Il est à noter que le spectre du LX2-Ac est plus intense que celui du LX2. Ceci peut s'interpréter de deux façons : ou bien le LX2-Ac possède une hélicité plus élevée que celle du LX2, ou bien le second montre une solubilité moindre dans les membranes. Il est difficile pour l'instant de trancher entre ces deux hypothèses.

Contrairement au LX2, on observe sur la Figure 4.5 une diminution de l'absorbance du peptide LX2-Ac en présence de cholestérol. Le fait que le peptide soit acétylé peut permettre une interaction différente avec les membranes que celle observée avec le LX2. Le cholestérol étant une molécule hydrophobe de $386,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ qui est présente en forte quantité (20%) dans les membranes, elle s'insère majoritairement au niveau des chaînes acyle des lipides entraînant une stabilité des membranes³⁴. Nous pouvons donc supposer que le LX2-Ac s'insère plus spécifiquement dans le cœur hydrophobe de la membrane. Quant au peptide LX2, puisqu'il semble moins sensible à la présence de cholestérol, on peut penser qu'il se place plus en surface des vésicules.

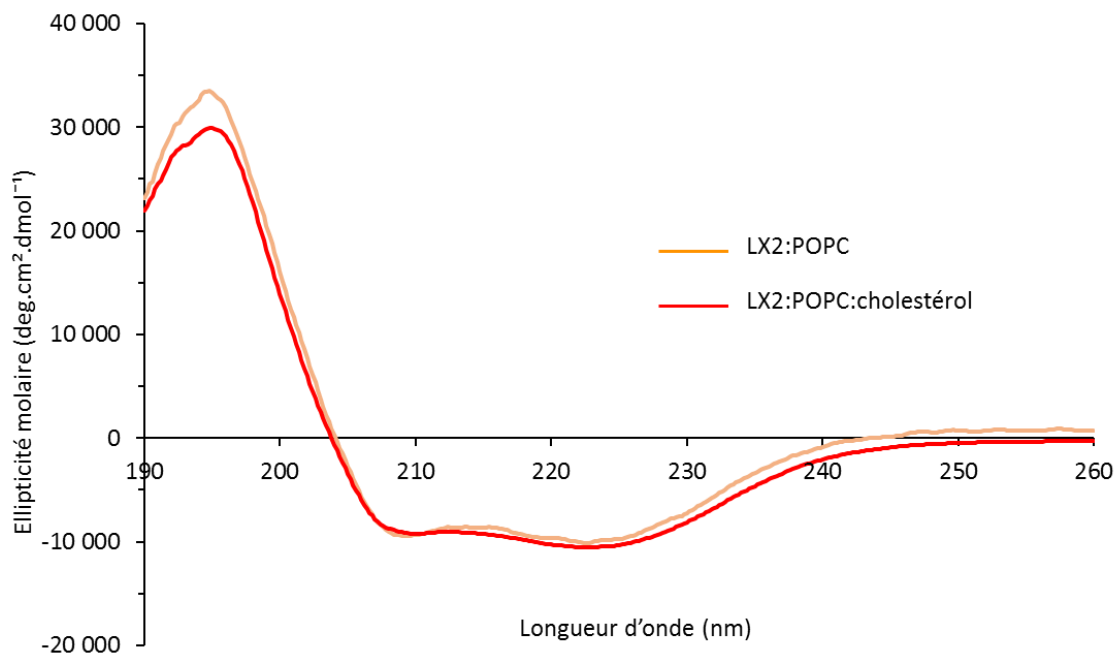


Figure 4.4. Spectres CD du peptide LX2 dans des membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol à un rapport molaire peptide:lipide (P:L) de 1:50

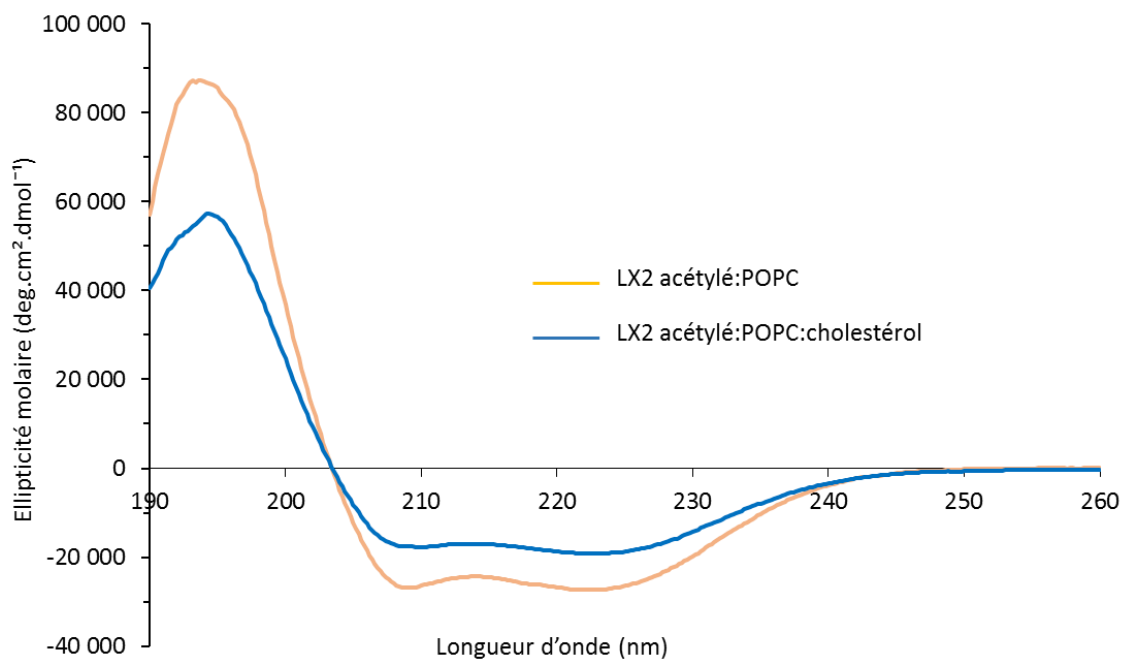


Figure 4.5. Spectres CD du peptide LX2-Ac dans des membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol à un rapport molaire peptide:lipide (P:L) de 1:50

4.2.3 Effet de la concentration de peptides

L'influence de la concentration en peptide dans des membranes modèles eucaryote a été étudiée (Figure 4.6). Le rapport molaire P:L a varié de 1:300 à 1:50, le rapport lipide:eau restant constant.

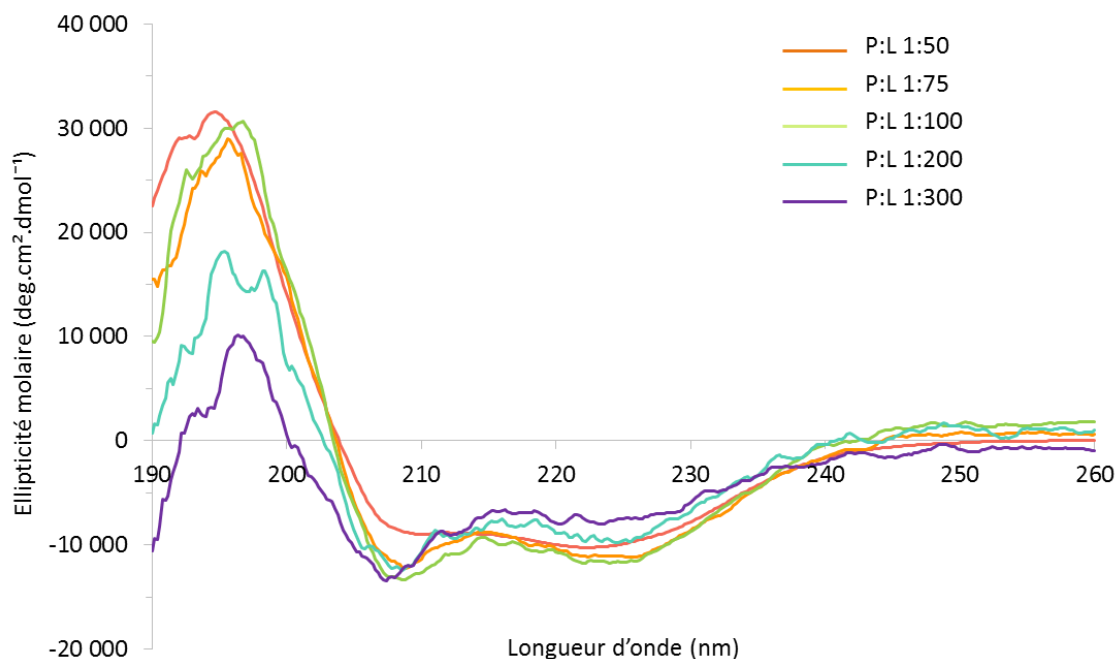


Figure 4.6. Spectres CD du peptide LX2 à différents rapports molaires dans des membranes de POPC-cholestérol à une température de 37°C

Les spectres montrent une influence de la concentration en peptide, principalement à faible concentration. À faible concentration, le spectre ressemble à celui observé dans le HFIP avec une intensité relative plus élevée à 208 nm. Lorsque la concentration en peptide augmente, on constate qu'à partir du rapport molaire P:L 1:100, la bande à 222 nm ne varie plus et l'allure générale des spectres reste semblable, typique d'une hélice- α . Ces changements de structure secondaire peuvent s'expliquer par une stabilisation des hélices amphiphiles sous forme d'oligomères. En effet, la concentration est un facteur bien connu qui influence la formation d'oligomères.

Cet effet de la concentration peut être analysé plus quantitativement en traçant la courbe du rapport de l'ellipticité des bandes à 208 et 222 en fonction de la concentration du rapport peptide/lipide (Figure 4.7). La courbe de tendance permet de constater une décroissance du rapport des deux bandes et cette décroissance est importante à une faible concentration en peptide dans les membranes. À partir du rapport P:L 1:100 on peut constater qu'on se rapproche d'un plateau. Cela permet donc de supposer que le peptide forme des oligomères et qu'à forte concentration, la proportion d'oligomères ne varie plus ou peu.

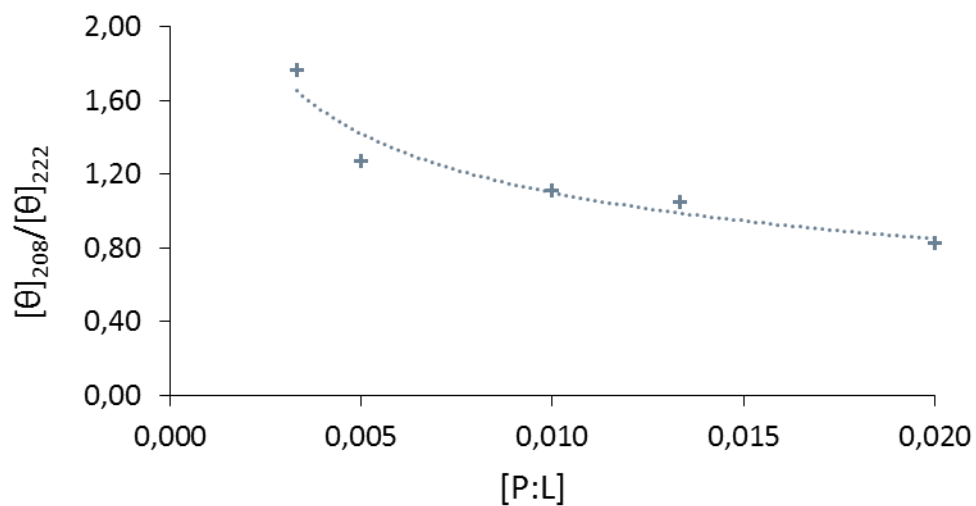


Figure 4.7. Rapport de l'ellipticité molaire à 208 et 222 nm en fonction du rapport molaire peptide:lipide (P:L).

4.2.4 Stabilité conformationnelle des peptides en fonction de la température

Les peptides ont été soumis à un gradient de température de 25 à 80 °C afin de connaître l'effet de la température sur leur conformation. L'augmentation de la température est connue pour induire la dénaturation des peptides et des protéines³⁵.

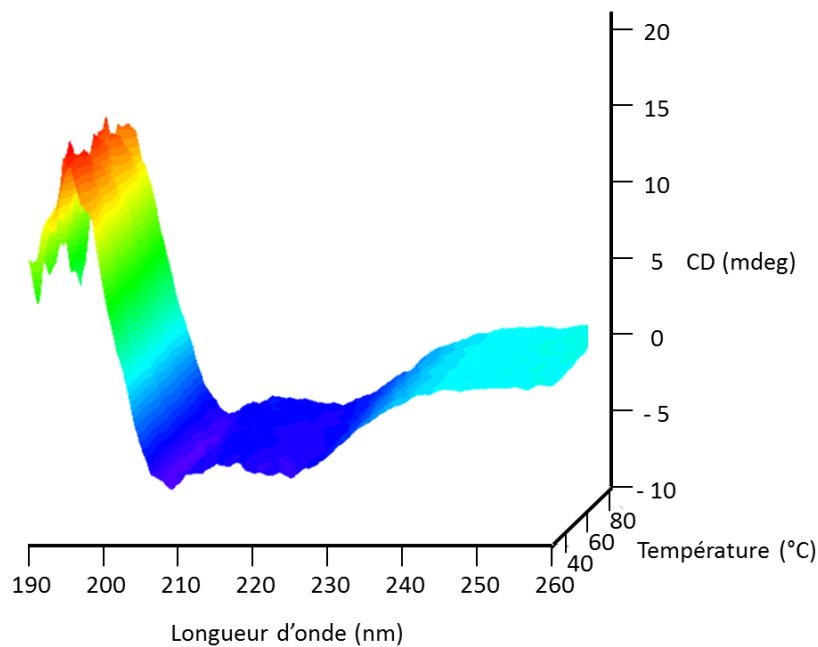


Figure 4.8. Spectres CD du LX2 en fonction de la température à un rapport molaire peptide:lipide (P:L) de 1:50

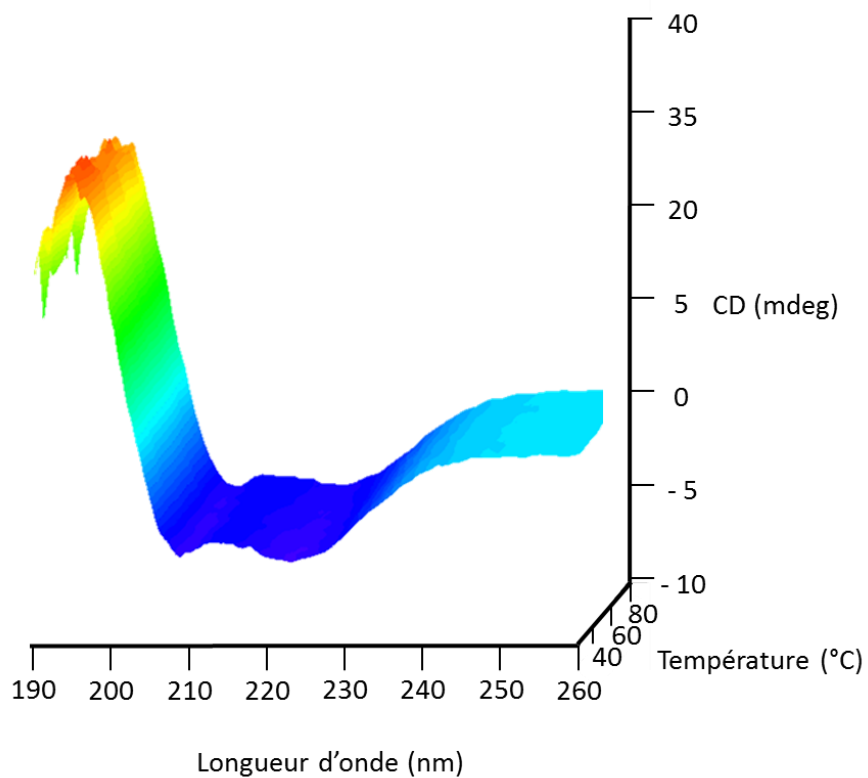


Figure 4.9. Spectres CD du LX2-Ac en fonction de la température à un rapport molaire peptide:lipide (P:L) de 1:50

Les figures 4.8 et 4.9 montrent que le LX2 et le LX2-Ac conservent une structure majoritairement en hélice- α à toutes les températures. Les deux peptides sont donc très stables thermiquement, et ce jusqu'à 80 °C.

Toutefois, une comparaison plus fine permet de déceler de faibles différences. Les Figures 4.10 et 4.11 montrent respectivement la comparaison des spectres de LX2 et LX2-Ac à 20 et 80 °C. Ces comparaisons montrent que dans les deux cas, il y a une très faible augmentation du rapport d'intensité des bandes à 208 et 222 nm à 80 °C par rapport à 20 °C, qui suggère une très faible diminution de l'hélicité des peptides au cours du chauffage. Les hélices formées par les peptides sont donc légèrement modifiées à haute température. Le fait que le rapport d'intensité 208/222 nm augmente suggère que certains acides aminés moins stables au sein de l'hélice ont tendance à adopter des angles dièdres correspondant à des structures plus désordonnées, probablement ceux en bout de chaînes.

Cependant, contrairement au LX2-Ac, le spectre du LX2 a une intensité globale plus faible à haute température qu'à basse température. Ce changement suggère que le LX2 perd un peu de sa conformation en hélice α avec l'augmentation de la température. Ce phénomène peut s'expliquer par une légère augmentation de la stabilité de LX2-Ac due à la présence du groupe acétyle en N-terminal (« *end capping effect* »)³⁶. Cependant, il est également possible que le LX2 soit moins soluble dans les membranes quand la température augmente.

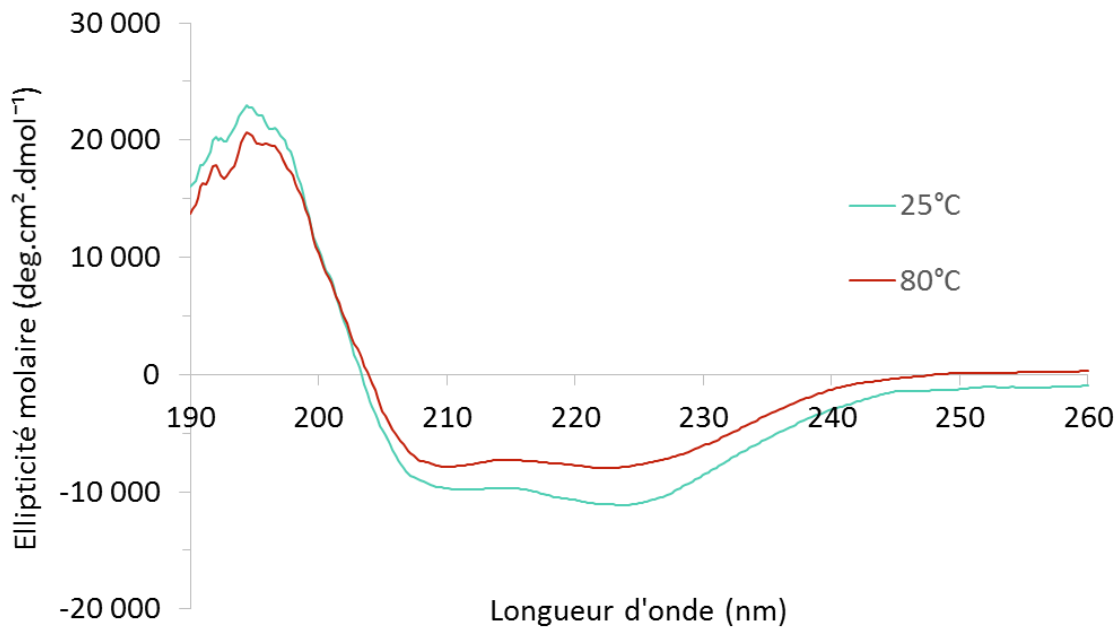


Figure 4.10. Spectres CD du peptide LX2 dans des membranes de POPC-cholestérol à 25 °C et 80 °C à un rapport molaire peptide:lipide (P:L) de 1:50

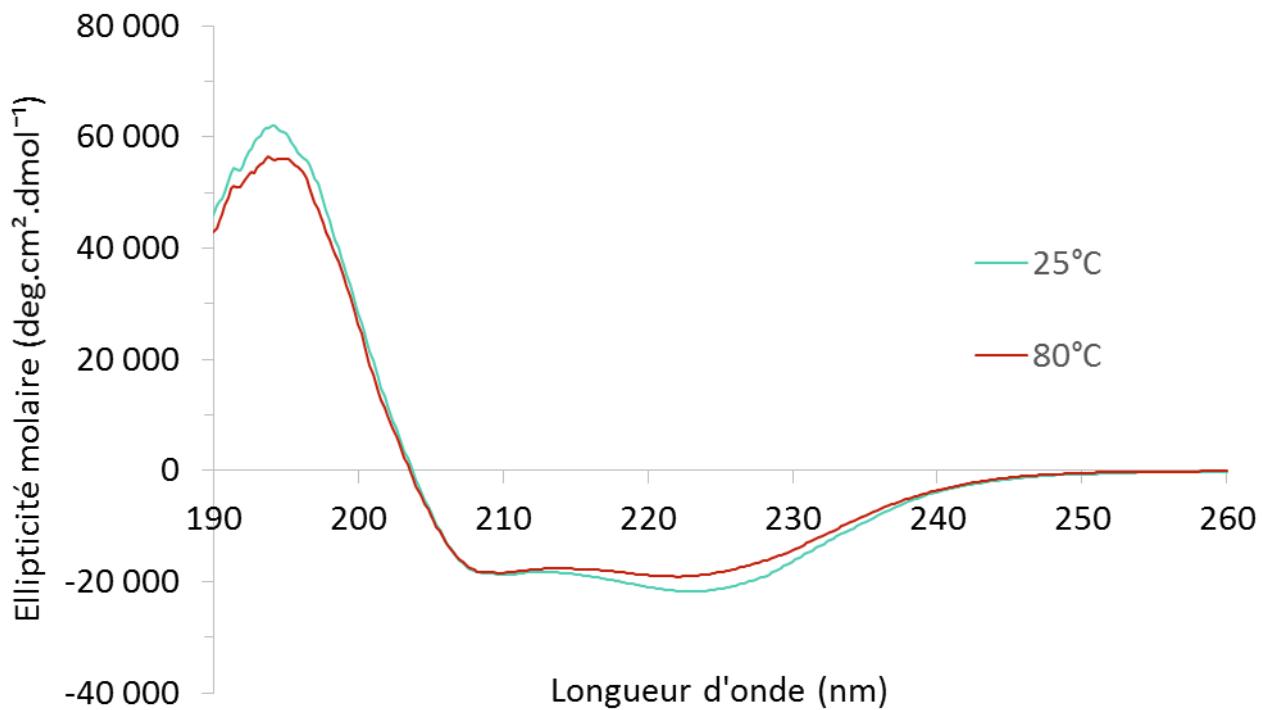


Figure 4.11. Spectres CD du peptide LX2-Ac dans des membranes de POPC-cholestérol à 25 °C et 80 °C à un rapport molaire peptide:lipide (P:L) de 1:50

Chapitre 5 : Étude des peptides LX2 et LX2 acétylé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

Les études de CD ont permis de déterminer une structure majoritairement en hélice- α pour les deux peptides en présence de membranes phospholipidiques. Ce résultat peut être confirmé par spectroscopie IR³⁷, qui permet de plus de déterminer l'effet du peptide sur les membranes.

5.1 Principe de la spectroscopie IR

La spectroscopie IR est une technique qui permet d'étudier la structure des molécules, car elle est sensible à leur conformation. Un échantillon absorbe une radiation IR qui va exciter les transitions vibrationnelles des molécules. Celles-ci vont vibrer à une certaine fréquence qui dépend de la force et de la polarité du lien vibrationnel qui est lui-même influencé par les effets intra et intermoléculaires. La position d'une bande d'absorption est déterminée par la masse vibrationnelle et le type de liaison. Lorsque la polarité du lien vibrationnel augmente, l'intensité d'absorption augmente. Dans le cas d'un peptide ou d'une protéine, l'environnement dans lequel elle se trouve a également un effet sur la fréquence de vibration³⁸.

La région de l'IR est comprise entre 0,780 et 1000 μm . Dans le cas des mélanges lipides-peptides, on va s'intéresser à la région du moyen IR comprise entre 2,5 μm et 50 μm (4000 – 200 cm^{-1})³⁸.

Trois régions du spectre sont étudiées (Figure 5.1) :

- La région de la bande d'élongation symétrique des groupements CH_2 (2850 cm^{-1}) qui permet d'obtenir de l'information sur les chaînes acyle des lipides.
- La région de la bande d'élongation des groupements carbonyle (vers 1730 cm^{-1}) qui donne de l'information sur la région interfaciale des lipides.

- La bande amide I' ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) qui permet de connaître la structure secondaire du peptide.

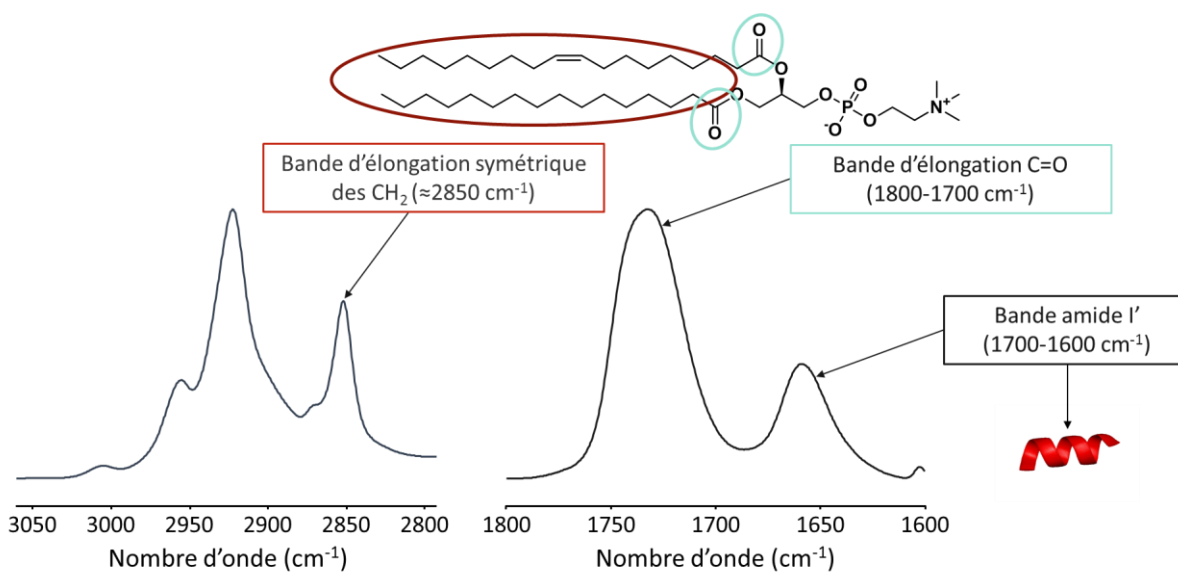


Figure 5.1. Spectre IR représentatif d'un mélange peptide-lipides avec les bandes d'élongation symétrique des groupements CH_2 , la bande l'élongation des groupements carbonyle et la bande amide I'

5.1.1 La bande amide I'

La bande amide I est due principalement de la vibration d'élongation des $\text{C}=\text{O}$ et à une faible contribution de la vibration d'élongation $\text{C}-\text{N}$ des liens amide. Afin d'éviter le chevauchement de la bande d'absorption de l'eau présente à 1645 cm^{-1} et de la bande amide I, il est nécessaire d'utiliser un tampon deutéré. L'utilisation du D_2O occasionne également un faible décalage de la bande amide I du fait de la deutération du lien $\text{N}-\text{H}$. Pour distinguer le mode amide I observé dans l'eau (H_2O), on parle du mode amide I' quand on utilise des tampons deutérés^{39,40}.

5.1.2 Le thermotropisme des lipides

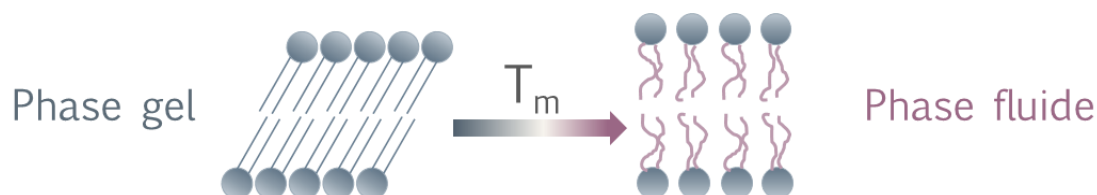


Figure 5.2. Schéma de la transition de phase d'une bicouche lipidique

Les bicouches lipidiques peuvent être dans une phase gel ou dans une phase fluide. Il existe une température à laquelle les lipides passent d'une phase à l'autre, c'est ce qu'on appelle la température de transition de phase (T_m). En dessous de T_m , les chaînes lipidiques sont majoritairement en conformation *anti*, donc très ordonnées. Au-dessus de T_m on observe la présence de chaînes en conformation *gauche*. C'est ce désordre des chaînes qui est caractéristique de la phase fluide. La transition de phase entraîne la fusion des chaînes, elle modifie légèrement l'épaisseur des bicouches lipidiques et augmente légèrement le volume occupé par les lipides, ce qui entraîne une diminution du nombre de molécules d'eau à la surface des bicouches. La spectroscopie IR permet d'étudier le thermotropisme des lipides, notamment la température de transition de phase des lipides lors du passage de l'état gel à l'état fluide.

5.1.3 Transition de phase des chaînes lipidiques

La transition de phase bicouches hydratées se traduit par une diminution de l'ordre des chaînes lipidiques. Au niveau du spectre IR, la bande d'élongation des groupements CH_2 des chaînes acyle est sensible à l'ordre des chaînes acyle des lipides⁴¹. En effet, la fréquence augmente à mesure que des conformères *gauche* apparaissent, ce qui permet de suivre le thermotropisme des lipides. En comparant le thermotropisme en présence et en absence de peptide, on peut obtenir une information sur l'insertion du peptide dans les bicouches.

5.1.4 Transition de phase des têtes polaires des lipides

La bande d'élongation des groupements carbonyle apparaît vers 1730 cm^{-1} ⁴¹. Elle est représentative des transformations moléculaires qui affectent la région interfaciale de la membrane. La Figure 5.3 présente cette bande, qui est composée de deux composantes vibrationnelles. Tout d'abord, il y a les C=O libres qui donnent naissance à une bande située vers 1740 cm^{-1} . Ensuite, on retrouve les C=O liés qui absorbent vers 1725 cm^{-1} . La première bande a une plus grande intensité que la deuxième en phase gel. Lors de la transition de phase, l'hydratation des C=O augmente et on observe une augmentation de l'intensité de la bande due aux C=O liés (hydratés) par rapport à l'intensité des C=O libres (non hydratés). Ce changement induit un déplacement global de la bande vers les plus bas nombres d'ondes. Cette bande permet ainsi de caractériser l'hydratation des bicouches lipidiques et de suivre la transition de phase des lipides⁴¹.

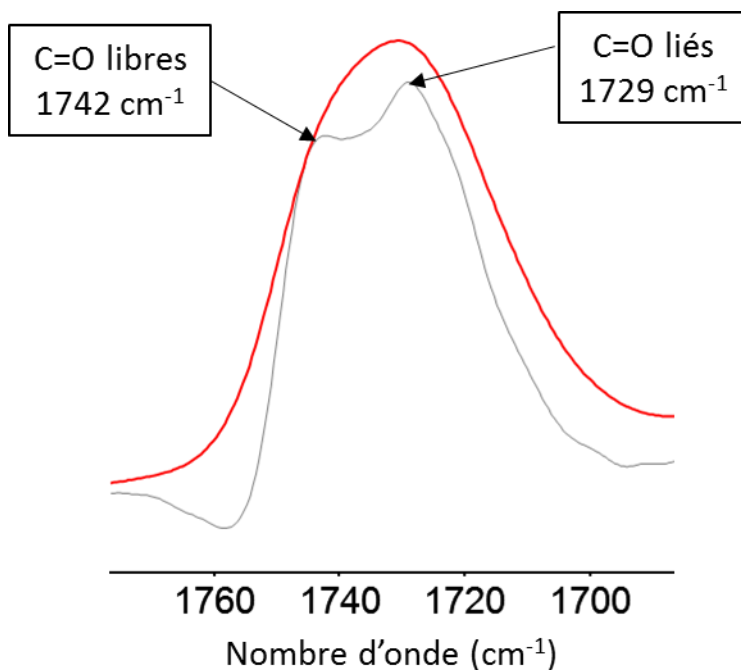


Figure 5.3. Spectre IR brut (en rouge) et déconvolué (en gris) de la bande d'élongation des groupements carbonyle des phospholipides

5.2 Résultats

5.2.1 Bande amide I'

Les bandes amide I' des deux peptides (Figure 5.4) sont centrées vers 1658 cm^{-1} et relativement étroites. Elles sont caractéristiques d'une structure majoritairement en hélice- α , ce qui confirme les résultats obtenus en CD. On peut néanmoins observer un léger décalage du maximum de la bande qui se situe à $1658,0\text{ cm}^{-1}$ pour le LX2 et à $1658,9\text{ cm}^{-1}$ pour le LX2-Ac. On peut également observer un épaulement vers 1673 cm^{-1} pour le peptide LX2 et un faible élargissement vers 1645 cm^{-1} pour le LX2-Ac. Ces différences indiquent des structures secondaires légèrement différentes pour les deux peptides. Il est raisonnable de penser que ces différences conformationnelles affectent principalement le segment peptidique situé près du N-terminal en raison de l'acétylation du peptide. Cependant, on ne peut exclure que la conformation globale des peptides soit légèrement affectée par une interaction/un positionnement différent avec les membranes.

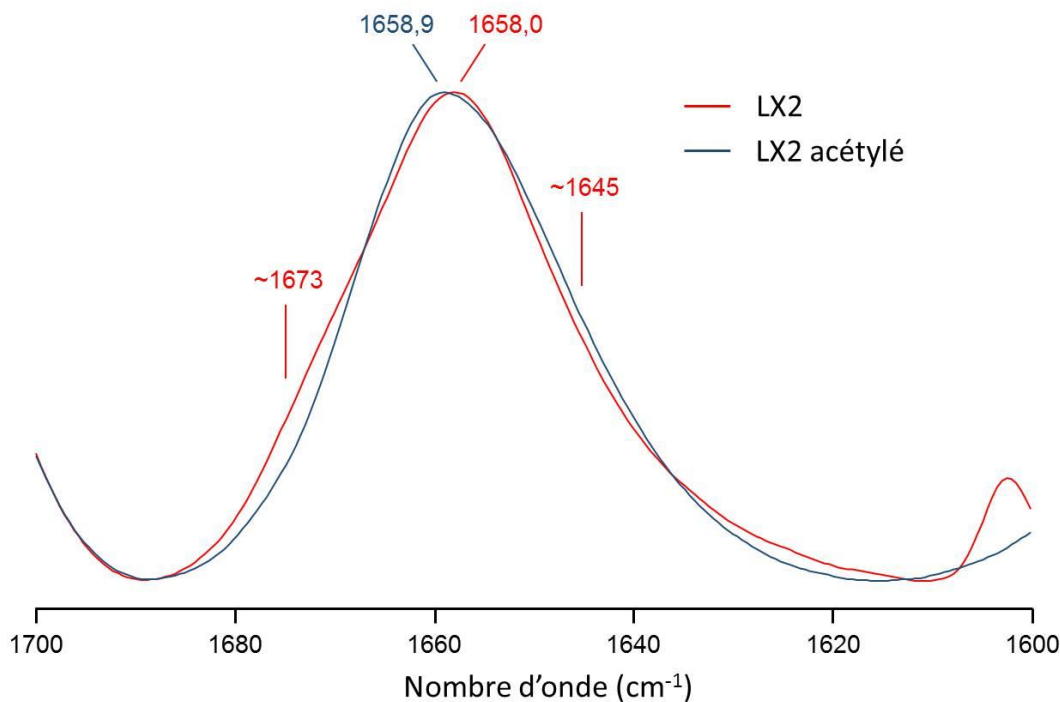


Figure 5.4. Bandes amide I' des peptides LX2 et LX2-Ac à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en présence de membranes composées de POPC et de cholestérol (rapport molaire peptide:lipide 1:50)

La déconvolution de Fourier est un procédé mathématique qui permet d'accentuer certaines différences. La Figure 5.5 montre les spectres déconvolués des peptides dans la région amide I'. On peut clairement constater la présence d'un pic à $1672,9 \text{ cm}^{-1}$ pour le LX2 qui correspond à l'épaule décrite ci-dessus. Une telle composante est en fait caractéristique du TFA. Cette bande n'est pas visible sur le spectre du LX2-Ac. Le TFA est utilisé lors du clivage des peptides et malgré les triturations et la lyophilisation des peptides, il peut à l'occasion en rester en faible quantité comme d'autres équipes l'ont expérimenté avec des peptides similaires⁴². La quantité de TFA résiduel est évaluée plus loin dans ce mémoire (voir chapitre 6). Les différences conformationnelles entre les peptides sont donc un peu plus faibles que ne le laissent croire en premier lieu les différences spectrales.

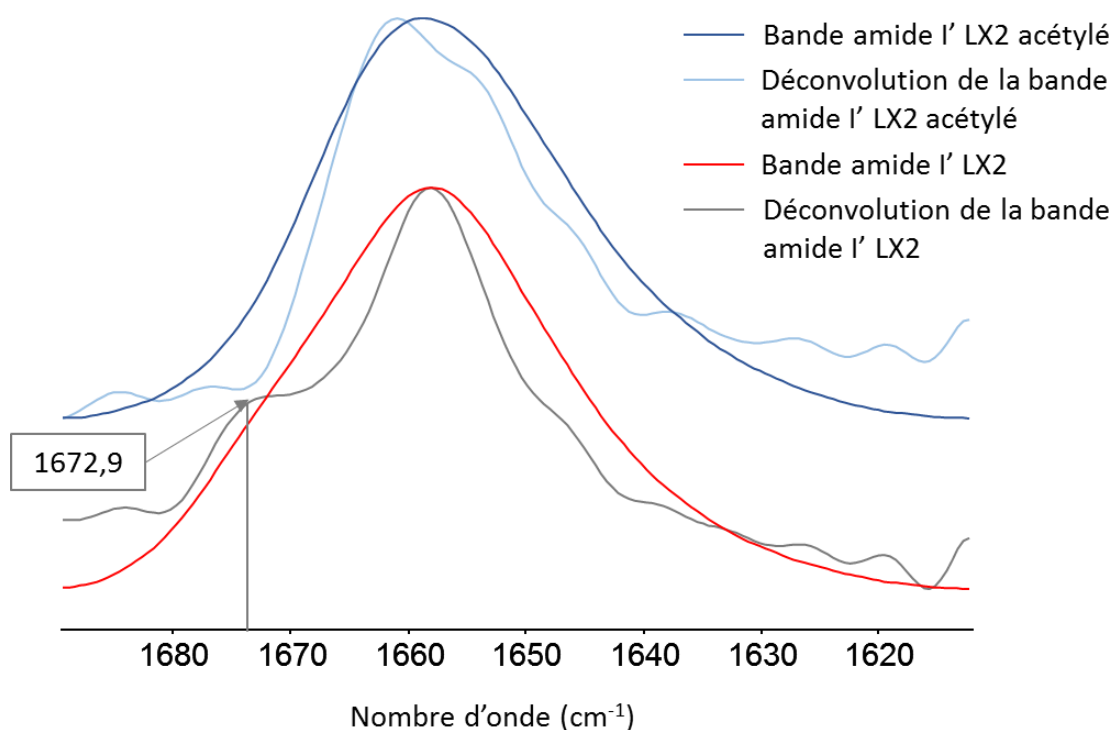


Figure 5.5. Bandes amide I' des peptides LX2 et LX2-Ac de la Figure 5.4 et leur déconvolution de Fourier

Afin d'examiner la stabilité thermique des deux peptides et d'observer s'il y a des changements dans la structure secondaire, les peptides ont été soumis à un gradient de température de 20 °C à 80 °C . La Figure 5.6 présente le spectre de la bande amide I' du

peptide LX2. Celui-ci montre un faible élargissement de la bande amide I' avec l'augmentation de la température ainsi qu'un déplacement du maximum de la bande, de $1658,0 \text{ cm}^{-1}$ pour le spectre à 20 °C à $1656,5 \text{ cm}^{-1}$ pour le spectre à 80 °C . Ces changements indiquent une faible réorganisation du peptide LX2 avec la température. Le décalage vers les bas nombres d'onde pourrait indiquer une augmentation des structures désordonnées au sein du peptide. Ces changements conformationnels avec le chauffage sont en accord avec les résultats de CD.

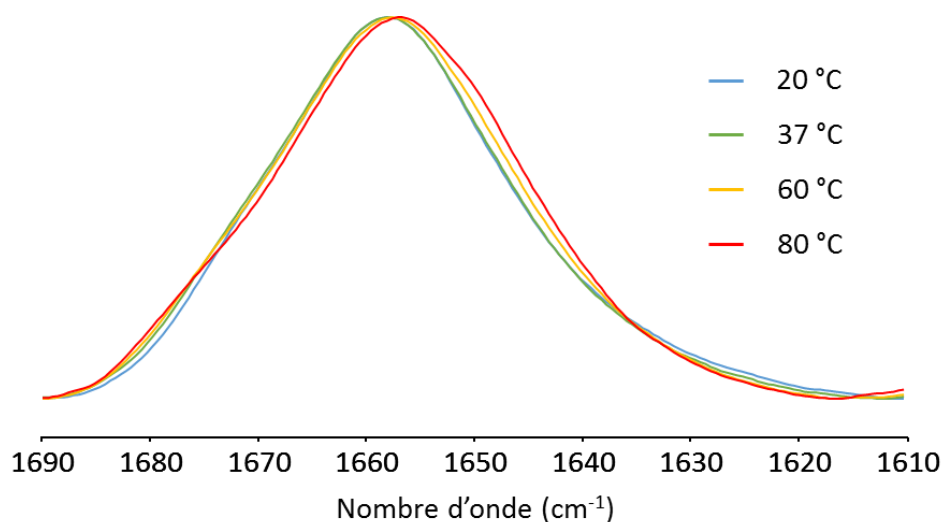


Figure 5.6. Bande amide I' du peptide LX2 en présence de membranes modèles eucaryotes à différentes températures

La Figure 5.7 présente le spectre du peptide LX2-Ac aux différentes températures. Celle-ci montre que le spectre s'élargit aussi avec l'augmentation de la température. De façon similaire, il y a un déplacement de la bande vers les bas nombres d'ondes, de $1658,9 \text{ cm}^{-1}$ pour le spectre à 20 °C à $1657,5 \text{ cm}^{-1}$ pour le spectre à 80 °C .

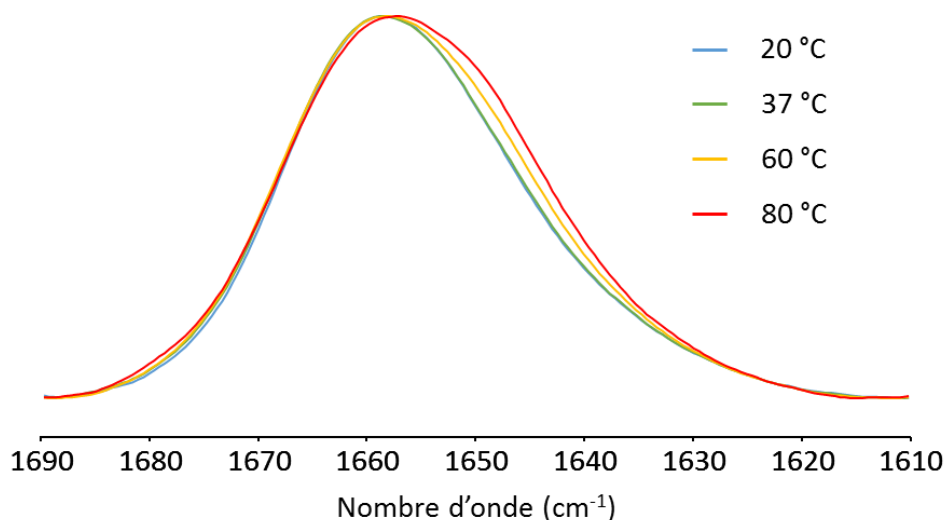


Figure 5.7. Bande amide I' du peptide LX2-Ac en présence de membranes modèles eucaryotes à différentes températures

On peut noter de plus que l'amplitude des déplacements de la bande amide I' entre 20 et 80 °C est la même pour les deux peptides, soit de 1,5-1,6 cm^{-1} . Ceci montre que les changements de conformation des peptides induits par la température sont les mêmes et que les deux peptides se comportent de la même manière.

5.2.2 Chaînes acyle des lipides

La température de transition de la POPC étant d'environ -5 °C, et les études étant réalisées entre 20 et 80 °C, les lipides sont étudiés uniquement dans la phase fluide, c'est-à-dire au moment où les conformères *gauche* apparaissent.

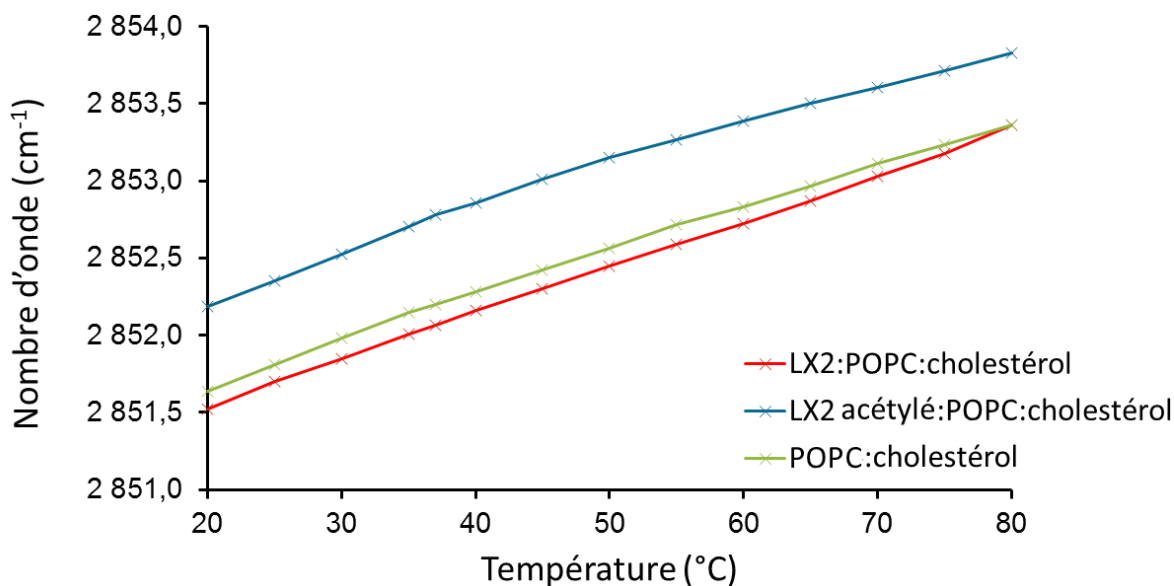


Figure 5.8. Position de la bande d'élongation symétrique des CH_2 en fonction de la température pour le mélange POPC-cholestérol, en absence et en présence de LX2 et LX2-Ac (rapport molaire peptide:lipide 1:50)

La Figure 5.8 montre l'évolution avec la température de la bande d'élongation symétrique des CH_2 pour les membranes modèles eucaryotes en absence et en présence de LX2 ou LX2-Ac. L'augmentation progressive du nombre d'ondes montre que les chaînes acyle adoptent de plus en plus de conformères *gauche* quand la température augmente, c'est-à-dire que le désordre des chaînes augmente.

On observe que la fréquence est légèrement plus faible en présence de LX2 à toutes les températures, ce qui suggère une légère diminution de l'ordre des chaînes acyle en présence du peptide. Cependant cette diminution est du même ordre de grandeur que l'incertitude sur la mesure et est donc à considérer avec précaution. Pour le LX2-Ac, il y a une augmentation significative de la fréquence qui indique une augmentation du désordre des chaînes acyle par rapport aux lipides seuls. Cette différence dans l'effet des peptides au niveau des chaînes lipidiques est probablement due à la profondeur d'insertion des peptides dans les membranes. La plus forte influence du LX2-Ac par rapport au LX2 suggère que le premier est inséré plus profondément dans la membrane et que le second se place plus proche de la région interfaciale. Une telle conclusion est en accord avec celle déjà tirée d'après les études CD.

5.2.3 Région interfaciale des lipides

La figure 5.9 montre l'évolution de la position de la bande d'élongation des groupements C=O en fonction de la température pour les membranes modèles eucaryotes seules, ainsi qu'en présence de LX2 ou LX2-Ac. Dans tous les cas, la bande diminue globalement en fréquence quand la température augmente, ce qui indique que les groupements carbonyle sont plus hydratés à plus haute température.

On observe un décalage de la bande vers des nombres d'onde plus faible en présence de LX2, ce qui montre que le peptide présente une hydratation plus élevée au niveau de la région interfaciale. Cela indique que le LX2 interagit avec les têtes polaires des lipides. La position de la bande semble augmenter légèrement à partir de 60 °C, ce qui suggère que le peptide interagit différemment avec les lipides à plus haute température. Il est possible que la position du peptide change légèrement avec la température et réduise son effet sur l'hydratation de la région interfaciale de la membrane.

Le LX2-Ac ne présente pas de modification significative au niveau de la bande d'élongation carbonyle, ce qui indique que le peptide n'interagit pas (ou peu) avec la région interfaciale des lipides. On peut cependant observer que l'allure des deux courbes en présences de peptides est similaire (légère diminution puis légère augmentation à partir de 60 °C). On peut supposer que cet effet est dû à la structure similaire des peptides qui réagissent de façon semblable avec la température.

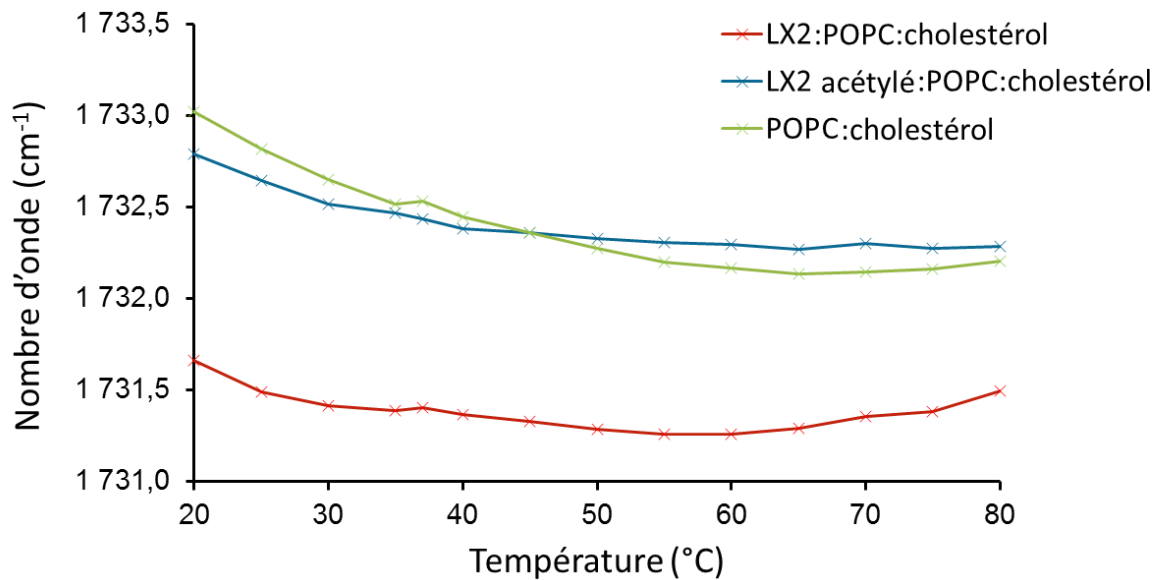


Figure 5.9. Position de la bande d'élongation des groupements carbonyle des phospholipides en fonction de la température pour le mélange POPC-cholestérol, en absence et en présence de LX2 et LX2-Ac (P:L 1:50)

Les effets constatés sur les deux parties des lipides laissent supposer que les peptides s'insèrent dans les membranes. Toutefois, le peptide LX2 est peut-être inséré moins profondément dans les membranes que le peptide acétylé et ceci expliquerait pourquoi le premier affecte plus les têtes polaires des lipides que les chaînes acyle, tandis que le deuxième affecte plus les chaînes acyle que les têtes polaires.

Chapitre 6 : Étude des peptides LX2 et LX2 acétylé par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire des solides

La résonance magnétique nucléaire des solides est une technique sensible qui permet d'étudier la structure et la dynamique des peptides et des membranes lipidiques⁴³. En RMN des solides on étudie l'anisotropie de différentes interactions. La fréquence dépend de l'axe de la molécule par rapport au champ magnétique B_0 ⁴⁴. La RMN permet l'étude de membranes modèles qui sont des grosses structures qui en solution ne tournent pas rapidement, contrairement aux petites molécules. Cet effet des membranes ne permet pas d'obtenir des spectres à haute résolution. Dans ce mémoire plusieurs noyaux ont été étudiés. Tout d'abord les noyaux phosphore-31 (^{31}P), deutérium (^2H), et fluor-19 (^{19}F) ont été étudiés en spectroscopie RMN des solides statique. Afin de connaître l'effet du peptide sur les membranes lipidiques, on a étudié les noyaux ^{31}P et ^2H . Pour obtenir de l'information sur le peptide, on a étudié le noyau ^{19}F en RMN statique et en rotation à l'angle magique. Les noyaux ^{13}C ont permis d'étudier la formation éventuelle d'oligomères du peptide grâce à la technique CODEX.

6.1 Principe de la RMN ^{31}P

Le ^{31}P est un noyau de spin $\frac{1}{2}$ avec une abondance naturelle de 100 %. Il permet d'obtenir de l'information sur les interactions entre le peptide et les têtes polaires des lipides. En spectroscopie RMN ^{31}P en mode statique, on observe l'anisotropie de déplacement chimique, qui permet d'obtenir de l'information sur la morphologie des bicouches des lipides. La Figure 6.1 présente les différents spectres obtenus en fonction des systèmes étudiés.

Trois types de mouvements lipidiques sont possible (Figure 6.1). Premièrement, un mode statique, c'est-à-dire sans mouvement. Ensuite, un mouvement de rotation axiale, dans ce cas le lipide tourne sur lui-même. Puis le troisième est un mouvement de rotation axiale plus une oscillation; à ce moment-là le lipide tourne sur lui-même en oscillant de gauche à droite. Plus il y a de mouvement, plus l'anisotropie de déplacement chimique diminue.

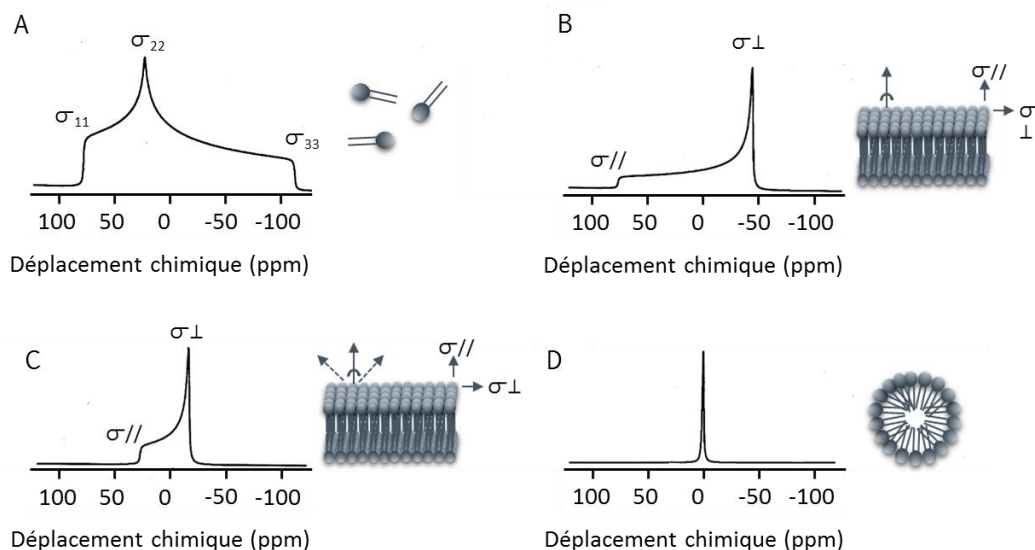


Figure 6.1. Spectres RMN ^{31}P des différentes phases lipidiques. (A) Spectre de poudre obtenue avec une phase solide; (B) phase gel; (C) phase fluide; (D) micelles⁴³

Le spectre A est typique d'un spectre de poudre. Il y a très peu de mouvements donc le spectre obtenu est large contrairement au spectre D qui est un pic isotrope. Dans ce dernier cas en effet, les micelles sont de petites structures avec beaucoup de mouvement donc le spectre obtenu est une moyenne de l'orientation des lipides, ce qui donne un spectre étroit. Les spectres B et C sont typiques de vésicules multilamellaires. Le spectre B représente un cas où seule la rotation des lipides sur eux-mêmes a lieu, les membranes étant assez rigides, ce qui conduit à une largeur spectrale d'environ 125 ppm. Les lipides correspondant à la figure C sont plus dynamiques dans les vésicules, qui sont donc moins rigides, de sorte que la largeur spectrale diminue à environ 50 ppm.

La forme des spectres (Figure 6.1) s'explique par une distribution sphérique des phospholipides dans le champ magnétique. La population de phospholipides perpendiculaires à B_0 étant plus importante on obtient σ_{\perp} qui est une moyenne des composantes σ_{22} et σ_{33} . Dans le cas des phospholipides parallèles à B_0 , on obtient $\sigma_{//}$ correspondant à la composante σ_{11} .

6.1.1 Résultats

La Figure 6.2 présente les spectres RMN du phosphore-31 des lipides en présence et en absence de cholestérol. L'allure des spectres est caractéristique des spectres de poudres avec des mouvements de rotation axiale et d'oscillation des lipides. L'épaulement présent sur les deux spectres correspond à un faible pic isotrope sous le spectre qui est dû à de petites structures qui sont très mobiles. Les deux spectres présentent un maximum au même déplacement chimique (-15 ppm) ainsi que la même anisotropie de déplacement chimique qui est d'environ 50 ppm. Ces spectres permettent de constater que l'ajout de cholestérol n'affecte pas les têtes polaires des bicouches de POPC. Dans les systèmes biologiques, le cholestérol n'est pas une molécule présente en surface des membranes.

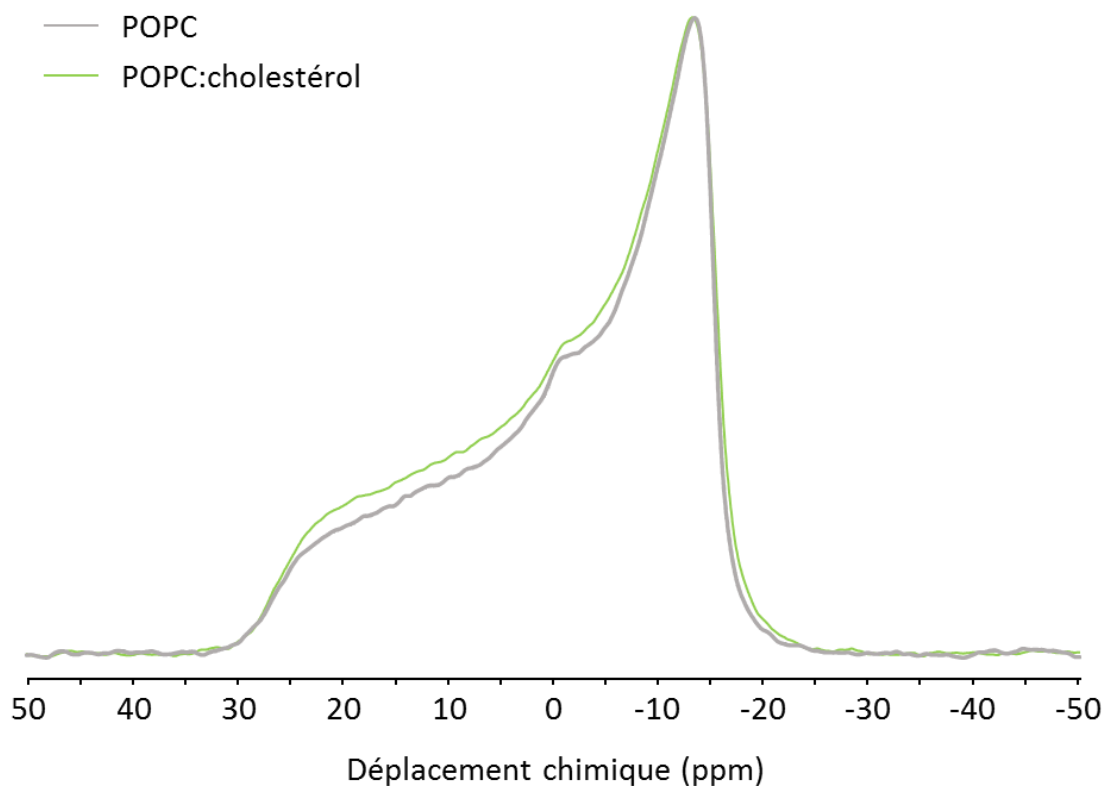


Figure 6.2 Spectres RMN ^{31}P de membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol à 37 °C

La Figure 6.3 montre les spectres RMN du phosphore-31 des membranes modèles eucaryotes en présence et en absence de LX2 et de LX2-Ac. On peut voir qu'il y a une diminution de l'anisotropie de déplacement chimique des bicouches de POPC-cholestérol en présence des deux peptides. Cette diminution montre que les peptides ont un effet de désordre sur les membranes qui sont donc moins rigides et plus déformables. L'effet est plus marqué sur le spectre du LX2-Ac. L'allure des spectres varie entre -10 et 30 ppm et les spectres en présence de peptides s'affaissent. Cette observation suggère une interaction entre les têtes polaires des lipides et les peptides.

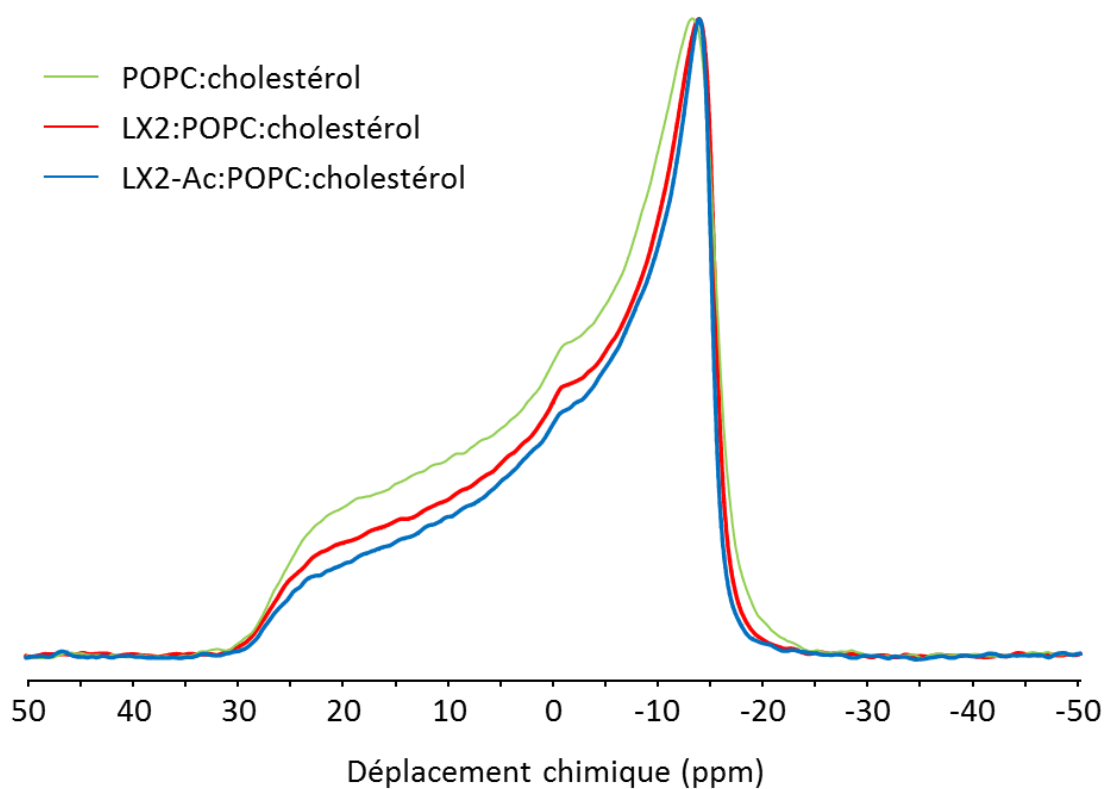


Figure 6.3 Spectres RMN ^{31}P à 37 °C des membranes modèles (en vert), des membranes avec le peptide LX2 (en rouge) et des membranes avec le peptide LX2-Ac (en bleu)

6.2 Principe de la RMN ^2H

Le ^2H est un noyau de spin de 1 et d'une abondance de 0,01%. En raison de cette faible abondance, on marque les chaînes des lipides au ^2H (Figure 6.4). Ce sont les interactions

quadrupolaires qui sont alors observées. La Figure 6.4 est un exemple de spectres obtenus en RMN ^2H , qui sont caractéristiques d'un mouvement de symétrie axiale des chaînes acyle des phospholipides par rapport à la normale à la bicouche. Le doublet central correspond aux CD_3 situés en bout de chaînes des lipides (plus mobiles) et les doublets les plus éloignés représentent les CD_2 proches des têtes polaires des lipides (moins mobiles).

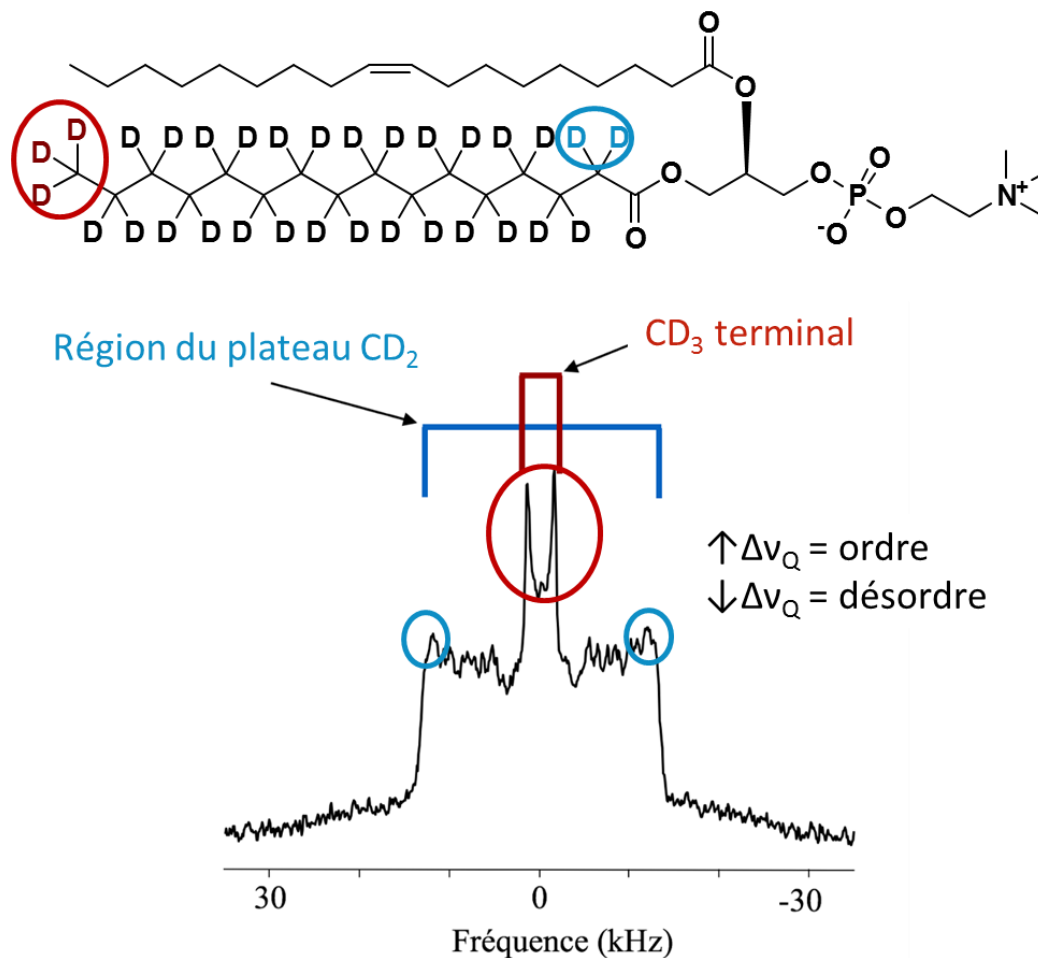


Figure 6.4 Spectres RMN ^2H de la POPC- d_{31}

Plus l'écart quadrupolaire diminue, plus les chaînes lipidiques sont désordonnées et plus l'écart quadrupolaire augmente plus il y a un effet d'ordre sur les chaînes des lipides. Ces spectres permettent donc de nous renseigner sur les interactions entre les molécules peptidiques et les bicouches.

6.2.1 Résultats

La Figure 6.5 présente les spectres de POPC-d₃₁ avec et sans cholestérol. Nous pouvons constater que l'ajout de cholestérol augmente l'écart quadrupolaire. Cette augmentation se traduit par un effet d'ordre au niveau des chaînes acyle des lipides. Comme on l'a vu plus haut, le cholestérol est une molécule qui se retrouve naturellement insérée au niveau des chaînes acyle des lipides dans des membranes biologiques. Il y a donc moins de mouvement possible au niveau des chaînes acyle conférant au cholestérol un rôle de rigidification.

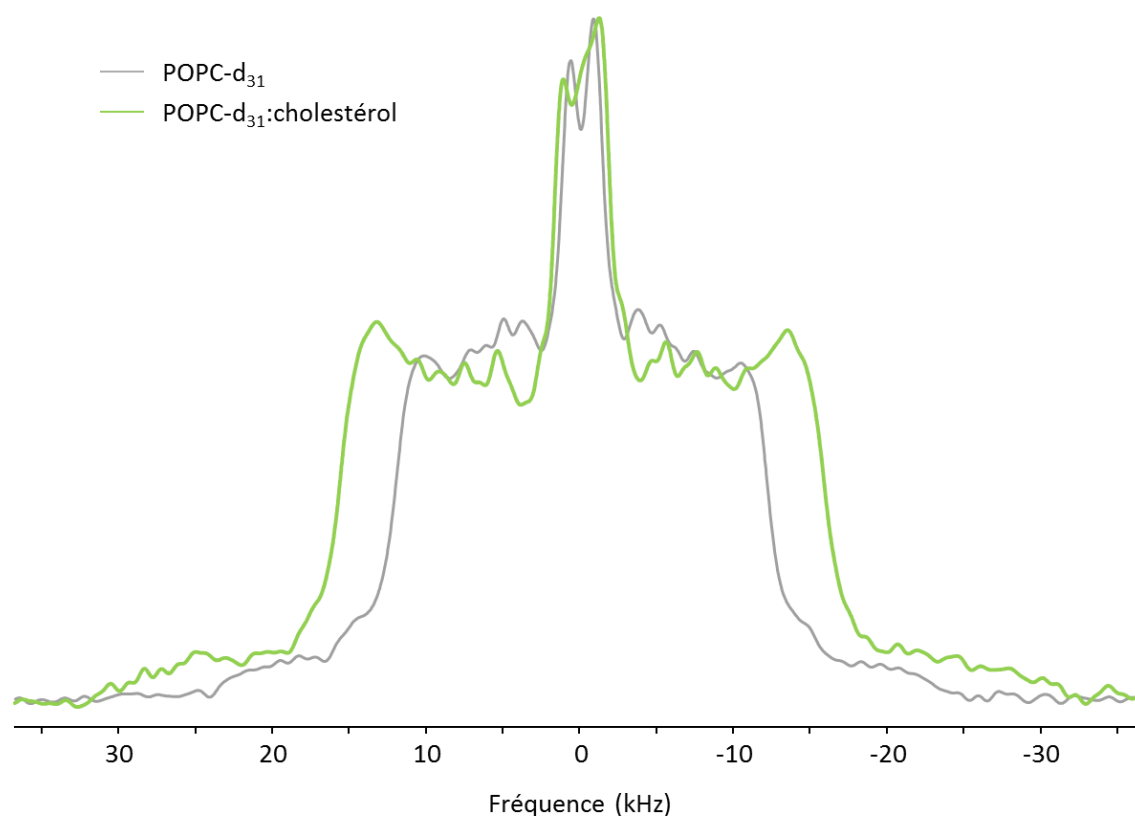


Figure 6.5 Spectres RMN ²H de membranes de POPC en présence (vert) et en absence (gris) de cholestérol à 37 °C

La Figure 6.6 montre une diminution de l'écart quadrupolaire en présence du peptide LX2 dans des membranes modèles de types eucaryotes. Le peptide a donc un effet de désordre sur les chaînes des lipides en augmentant leur mobilité. Cela montre que le peptide est bien inséré

dans les bicouches. Si on suppose, comme le suggère les résultats précédents, que le LX2 est situé près de la région interfaciale, cette localisation pourrait induire une augmentation de l'aire moléculaire latérale des lipides et ainsi induire une augmentation de la mobilité des chaînes.

Les résultats de RMN ^2H ne montrent pas (ou très peu) d'effet du peptide LX2-Ac sur les membranes des lipides. Les études par spectroscopie IR avait conduit à supposer un léger effet d'ordre sur les chaînes acyle. Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer par le fait que la position de bande de vibration d'élongation des CH_2 est sensible au désordre conformationnel alors que la RMN ^2H est sensible à la dynamique des chaînes lipidiques.

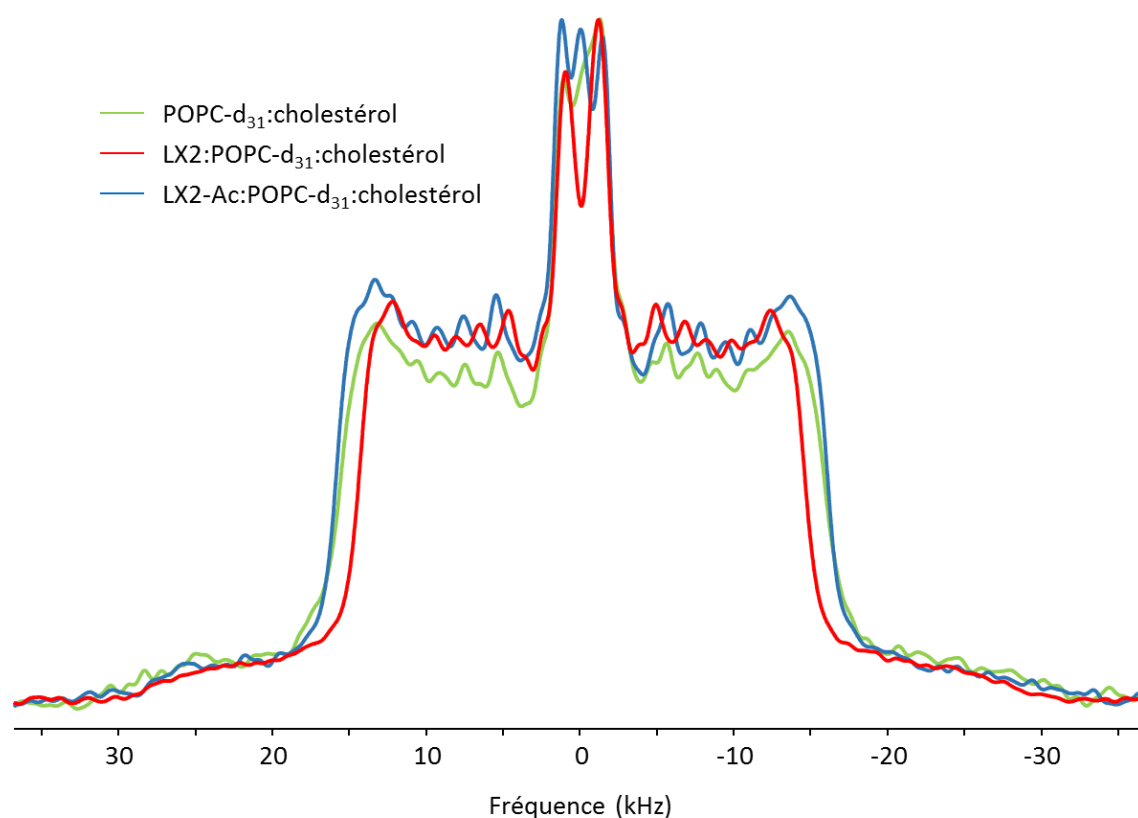


Figure 6.6 Spectres RMN ^2H des membranes modèles seules (vert), et en présence de LX2 (en rouge), et de LX2-Ac (en bleu), à 37 °C

6.3 Principe de la RMN ^{19}F

Le noyau ^{19}F a un spin de $\frac{1}{2}$ et une abondance de 100%. La RMN ^{19}F a une sensibilité élevée, c'est pour cette raison que c'est une bonne sonde pour les études biochimiques. Il est possible d'obtenir de l'information sur les interactions entre les peptides et les membranes. De plus la RMN ^{19}F peut être utilisée avec une technique appelée le CODEX qui permet d'effectuer des mesures de distance (voir chapitre 7).

6.3.1 Résultats

La Figure 6.7 représente les spectres RMN du fluor en mode statique des peptides LX2 et LX2-Ac en présence de membranes modèles. On peut constater qu'il y a deux pics, un pic large vers -62,5 ppm et un pic étroit à -73,4 ppm. Le premier à 62,5 ppm représente le peptide. Sa largeur est due à l'insertion des peptides dans les membranes. Plus spécifiquement, les CF_3 des acides aminés fluorés sont peu mobiles et entraînent un spectre large. Le pic est également asymétrique, avec un épaulement vers -58 ppm. On peut constater que le spectre du LX2-Ac est un peu plus large et que l'épaulement est plus marqué. Nous pouvons supposer que son insertion à l'intérieur de la bicouche permet légèrement moins de mouvements que pour le peptide LX2.

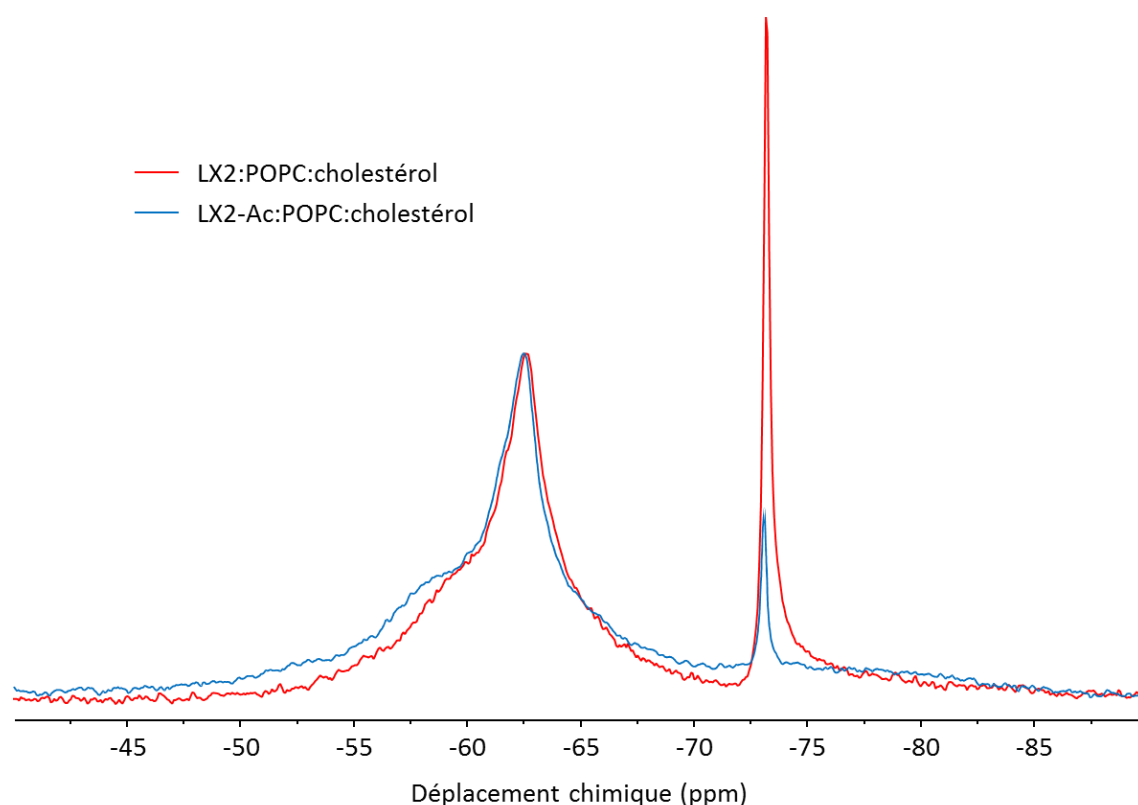


Figure 6.7 Spectres RMN ^{19}F du peptide LX2 (rouge) et du peptide LX2-Ac (bleu) dans les membranes modèles de type eucaryote

Afin de mieux mettre en évidence et de mieux comprendre l'origine de l'épaulement présent sur ces spectres, des études en rotation à l'angle magique ont été effectuées. Ces expériences sont décrites dans la partie qui suit.

Le pic isotrope à -73,4 ppm est un pic dû au TFA qui est présent en faible quantité. La présence du TFA avait été identifiée dans les spectres IR dans la région amide I' du LX2. Le TFA est utilisé lors du clivage de la résine qui a lieu en milieu acide. L'évaporation et la trituration ne sont pas suffisantes pour extraire la totalité du TFA⁴⁵. Le TFA a été utilisé comme référence tout au long des manipulations. La Figure 6.8 nous montre le déplacement chimique du pic du TFA pur qui est à 76,5 ppm. Après une dilution au 1000^{ème} dans le tampon, le pic de TFA a un déplacement chimique de -73,4 ppm, qui correspond exactement au pic obtenu dans l'échantillon. Nous avons quantifié le pourcentage massique de cette

impureté pour chacun des peptides. Pour le LX2, le TFA, qui sert de contre-ion au N-terminal, représente 6% de la masse du peptide et pour le LX2-Ac, cette impureté représente 1,5%. On peut supposer que cette impureté peut modifier très légèrement les interactions peptides-membranes, mais cet effet est probablement négligeable en raison de la faible quantité d'impureté.

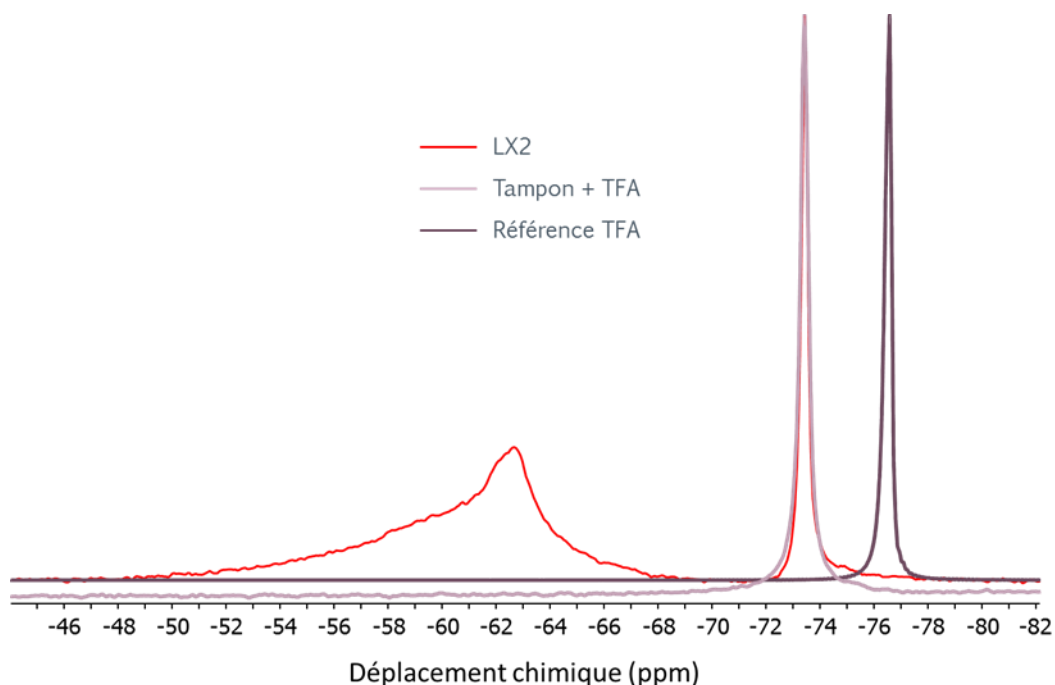


Figure 6.8 Spectre RMN ¹⁹F de peptide LX2 dans les membranes modèles (rouge); spectre RMN ¹⁹F de la dilution au 1 000ème du TFA dans le tampon (rose); spectre RMN ¹⁹F du TFA (mauve)

6.4 Rotation à l'angle magique

Nous avons constaté qu'il y a un épaulement vers -58 ppm pour les deux peptides (Figure 6.1). Afin de vérifier si celui-ci est dû à la présence de plusieurs populations de peptides différentes ou si il n'y a qu'une population insérée entièrement dans les membranes, la rotation à l'angle magique a été nécessaire. Comme le montre la Figure 6.9 la rotation à l'angle magique consiste à faire tourner un échantillon à un angle $\theta = 54,7^\circ$ par rapport au champ magnétique B_0 .

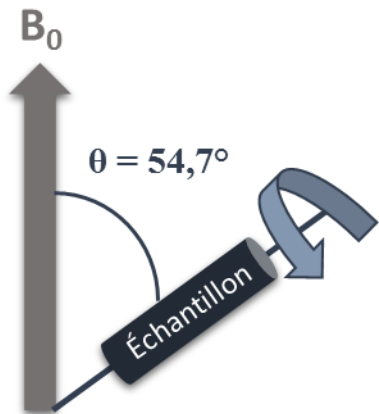


Figure 6.9 Schéma du principe de la rotation à l'angle magique; B_0 (champ magnétique); θ angle magique de rotation

Prenons la formule de l'anisotropie de déplacement chimique :

$$\nu(\theta) = \delta_{iso} + \delta_{aniso} \times \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \quad \text{Équation 6.1}$$

$\nu(\theta)$: Fréquence

δ_{iso} : Déplacement chimique isotrope

δ_{aniso} : Constante d'anisotropie de déplacement chimique

θ : Angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique

En spectroscopie RMN, la fréquence dépend de l'orientation des molécules par rapport au champ magnétique. La fréquence varie selon le facteur $(3 \cos^2 \theta - 1)/2$, et lorsque $\theta = 54,7^\circ$ celui-ci devient nul et il reste seulement la composante isotrope. Cette composante se traduit par une moyenne de tous les mouvements dans l'échantillon⁴⁶.

6.4.1 Résultats

La Figure 6.10 représente les spectres RMN ^{19}F en rotation à l'angle magique. L'échantillon a été soumis à une rotation de 5 000 Hz. On observe un seul pic pour les deux peptides, ce

qui montre qu'il n'y a qu'une seule population pour les deux peptides lorsqu'ils sont au sein des membranes. Par ailleurs, comme pour les spectres statiques, on peut voir que le spectre du peptide LX2-Ac est légèrement plus large que celui du LX2. On peut également observer des bandes latérales de rotation (*spinning sidebands*) à -50 et -76 ppm.

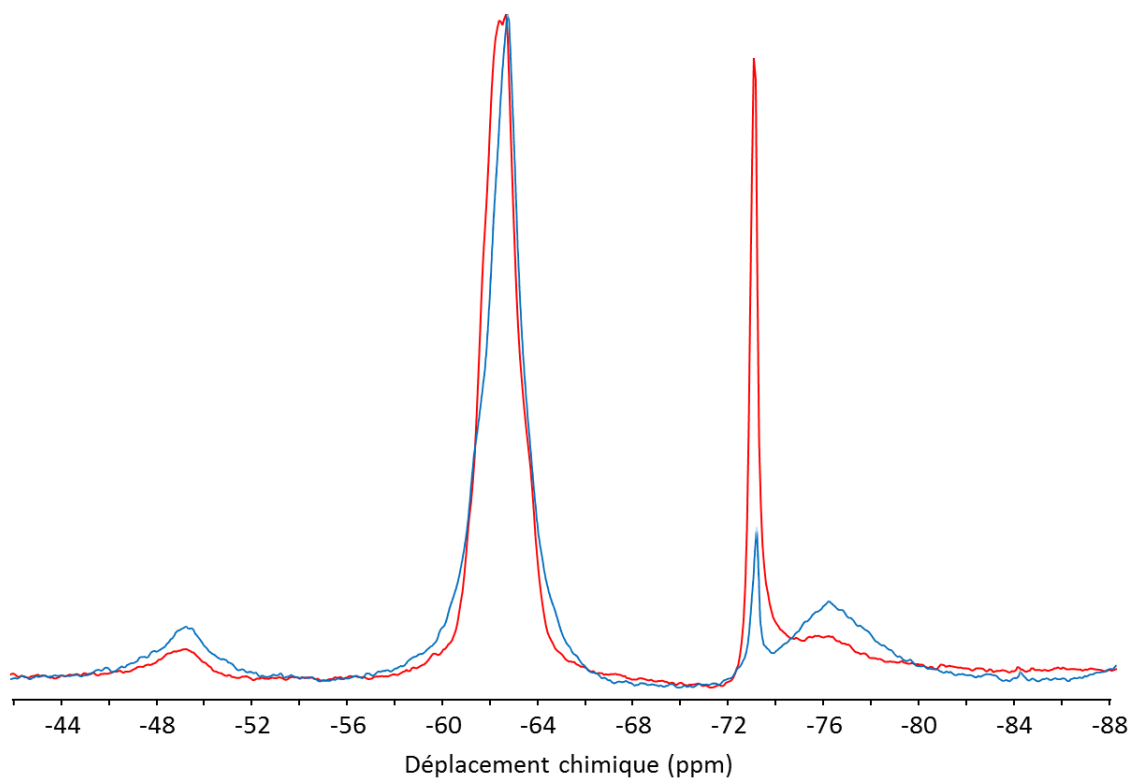


Figure 6.10 Spectre RMN ^{19}F en rotation à l'angle magique des peptides LX2 (rouge) et LX2-Ac (bleu); température 37 °C

Chapitre 7 : Étude de l'oligomérisation des peptides par CODEX

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été réalisés seulement sur le peptide LX2. Le CODEX (Centerband-Only Detection of EXchange) est une technique homonucléaire qui permet de déterminer l'oligomérisation des peptides grâce à la diffusion de spins du fluor ou du carbone. Dans les cas du peptide LX2, ces deux noyaux ont été étudiés. Tout d'abord, comme le peptide possède des acides aminés fluorés, la technique CODEX en fluor-19 a été priorisée. Ce choix repose notamment sur la diffusion de spins du ^{19}F qui est plus sensible d'un facteur d'environ 500 par rapport à celle du ^{13}C ⁴⁷. Cette analyse se fait en rotation à l'angle magique afin de supprimer l'ADC et les interactions homonucléaires dipôle-dipôle.

La Figure 7.1 présente la séquence d'impulsion CODEX utilisée. L'ADC est réintroduite de façon virtuelle grâce à cette une séquence d'impulsions⁴⁸. Les spins évoluent sous l'ADC qui est réintroduite à partir de 2 impulsions déphasées de 180° par période de rotor, ce qui se fait de façon indépendante de la vitesse de rotation. La magnétisation est stockée le long de l'axe z de sorte que le spin ne précesse pas ou ne se déphase pas pendant le temps de mélange. Le temps de mélange est un nombre entier qui est un multiple de périodes de rotor. Il est suivi d'une autre séquence d'impulsions; si aucun mouvement n'a eu lieu pendant ce temps de mélange, l'ADC est reconduite au début de la détection. Cependant, si pendant le temps de mélange, la diffusion de spins change suite à un mouvement (de l'ordre de la seconde ou de la milliseconde), le déplacement chimique est transféré au début de la seconde période d'impulsions. La dernière séquence d'impulsions (2 impulsions à 90°) correspondant à une période de rotor permet d'éliminer les bandes de rotation, qui autrement encombreraient le spectre⁴⁹.

Un spectre de référence, appelé S_0 , est obtenu en inversant le temps de mélange (t_m) et la dernière partie de la séquence d'impulsions. Celui-ci est utilisé pour obtenir la courbe de décroissance de S/S_0 , qui va permettre en principe de définir le taux d'oligomérisation des peptides⁴⁷.

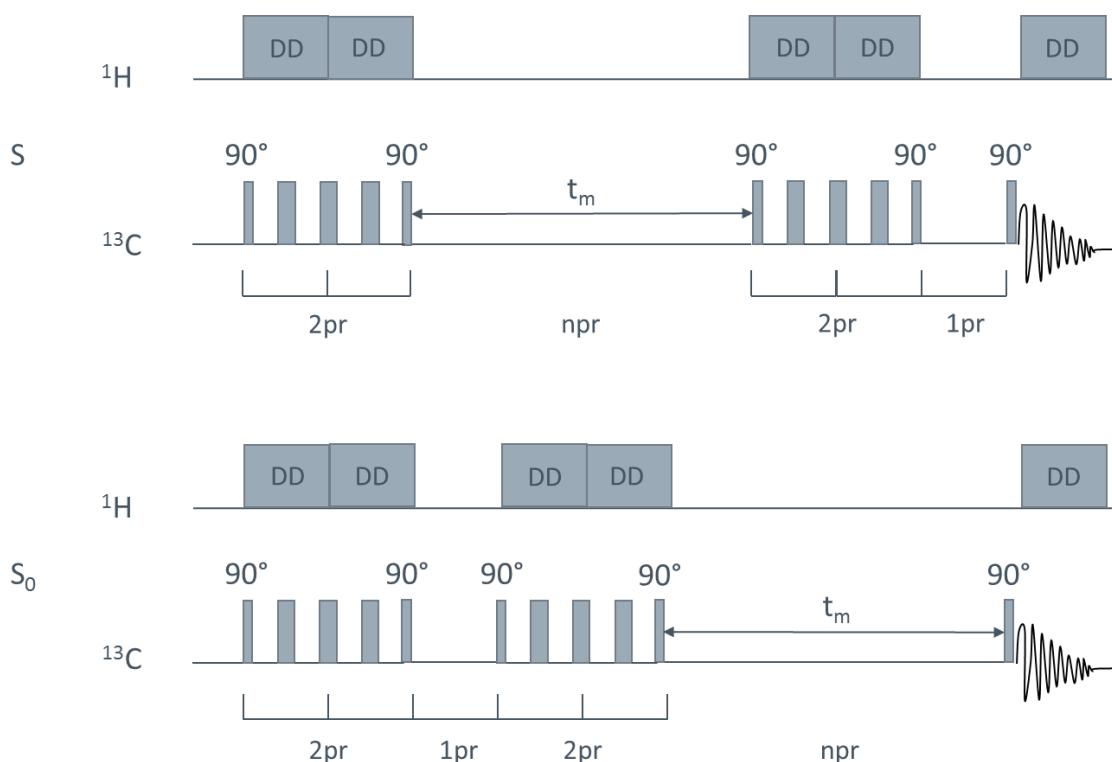


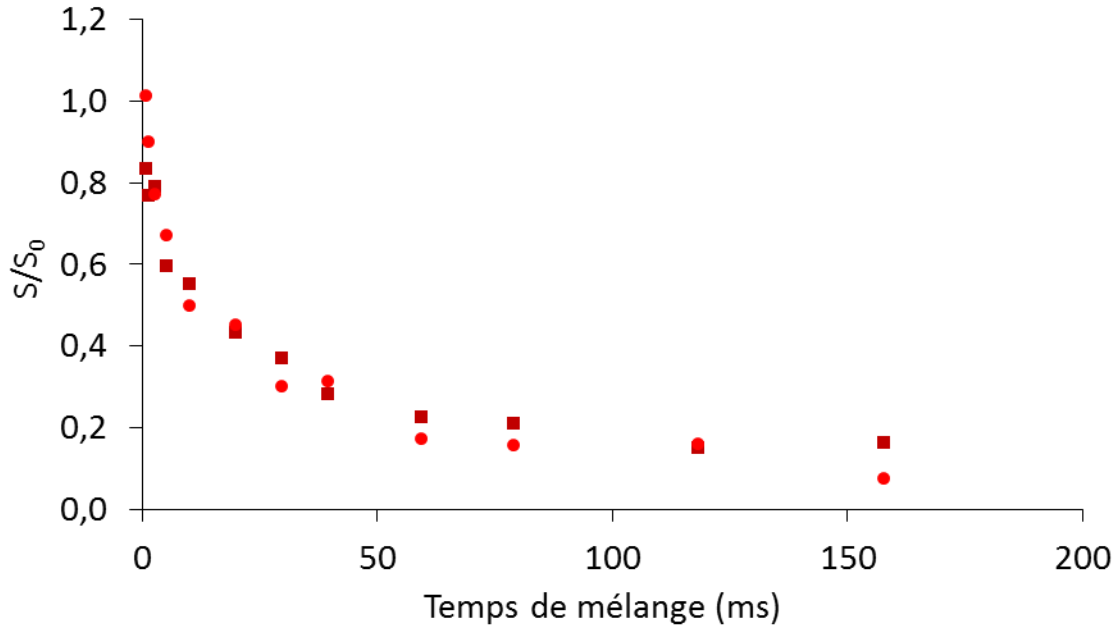
Figure 7.1. Séquence d'impulsions de CODEX

Si on définit l'équilibre S/S_0 par M , alors le nombre d'oligomères est égal à $1/M$. La méthode CODEX donne une mesure globale des distances et il n'est donc pas possible de connaître la distance entre chacune des molécules de l'oligomère⁴⁷.

7.1 CODEX ^{19}F

Des études CODEX en RMN du fluor-19 ont démontré qu'il est possible de déterminer des distances ^{19}F - ^{19}F au-delà 15 \AA ^{50,51}. Afin de diminuer les mouvements nuisibles à la mesure, et de détecter les mouvements lents, les analyses doivent être réalisées à très basse température (aux alentours de $-40 \text{ }^\circ\text{C}$).

Les analyses ont été réalisées à $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ afin de vérifier la méthode. Deux échantillons ont été testés. Les courbes de décroissance en fonction du temps de mélange ont été tracées. La figure 7.2 montre que la méthode est très reproductible. De plus, le plateau est atteint à $S/S_0=0,16$ ce qui pourrait correspondre à un hexamère à une concentration de 4:100 P:L.



*Figure 7.2. Courbes de l'analyse CODEX du peptide LX2 dans des membranes
POPC:cholestérol (P:L 4:100) en RMN ¹⁹F à -40 °C*

La même expérience a été faite à un rapport P:L 2:100 (Figure 7.3). On peut voir que le 11^{ème} point est aberrant, c'est pourquoi la courbe a été refaite avec seulement 8 points (courbe avec les croix). Nous pouvons constater qu'à ce rapport molaire, les courbes décroissent de façon moins régulière, la méthode est un peu moins reproductible. On constate que le plateau est atteint pour $S/S_0 = 0,12$, ce qui pourrait correspondre à un octamère.

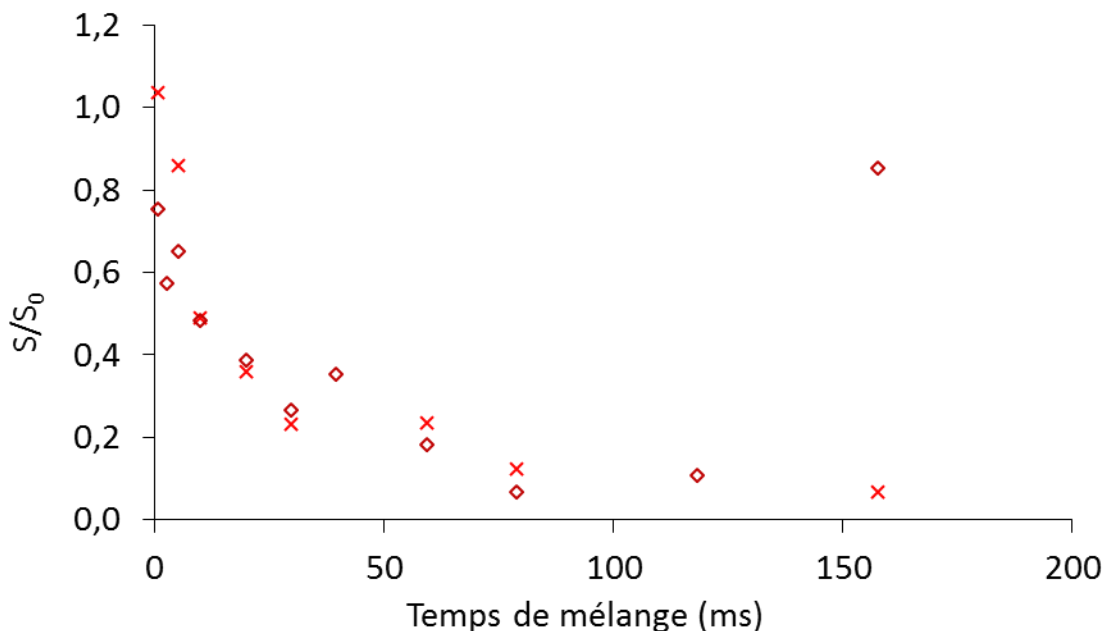


Figure 7.3. Courbes de l'analyse CODEX du peptide LX2 dans des membranes POPC:cholestérol (P:L 2:100) en RMN ^{19}F à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$

Il pourrait donc sembler que la taille de l'oligomère change avec la concentration en peptide. Cependant, l'oligomère le plus grand est favorisé à plus faible concentration, ce qui va à l'encontre de ce qui est attendu (l'oligomère devrait être plus grand à plus haute concentration). En fait, il s'avère que ces expériences sont particulièrement difficiles à interpréter car le peptide LX2 possède six groupements CF_3 . Comme les mesures en CODEX ne sont possibles qu'entre atomes séparés par des distances maximales d'environ 15 \AA , il est évident que les distances intramoléculaires interfèrent lors de la mesure. Les courbes de décroissance S/S_0 ne peuvent donc être analysées uniquement en termes de distances intermoléculaires, c'est-à-dire en termes d'oligomérisation.

Pour éviter les interactions intramoléculaires et déterminer les mesures de distances, il serait donc préférable d'utiliser un peptide marqué à une seule position, ce qui ne rendrait plus le peptide amphiphile. Afin de conserver les propriétés du peptide, nous avons décidé d'utiliser une leucine marquée au ^{13}C sur le carbonyle.

7.2 CODEX RMN ^{13}C

Le ^{13}C est un noyau de spin $\frac{1}{2}$ et de faible abondance naturelle (1,1%). Les études CODEX ont été effectuées pour déterminer l'oligomérisation des peptides LX2 et LX2-Ac à partir d'un résidu leucine marqué au ^{13}C sur le carbonyle et inséré en position 12 des peptides lors de la synthèse. Le choix de la position du marquage au ^{13}C repose sur des études de modélisations permettant d'estimer les distances les plus courtes entre les groupes carbonyle des différents acides aminés du peptide pour des configurations en tétramères et trimères. Ces études ont été réalisées dans le laboratoire du Pr Lagüe. Ces études ont permis d'établir que le résidu leucine, marqué sur le carbonyle à la position 12, était favorable à des mesures de distance CODEX ^{13}C - ^{13}C . En effet, cette position semble appropriée en raison de la proximité de la leucine avec le centre des oligomères. De plus sa position est approximativement au centre du canal et permet donc d'avoir accès au taux d'oligomérisation des peptides en position parallèle ou antiparallèle.

acides aminés	¹³ C	distance moyenne (Å)	déviati on standard
L	1	11,82	0,43
X	2	7,53	0,31
L	3	11,19	0,35
L	4	13,46	0,35
L	5	9,35	0,29
X	6	8,39	0,27
L	7	13,06	0,33
L	8	11,91	0,33
X	9	7,45	0,25
L	10	11,08	0,3
L	11	13,45	0,34
L	12	9,37	0,29
X	13	8,37	0,26
L	14	13,06	0,34
L	15	11,85	0,33
X	16	7,47	0,27
L	17	11,20	0,33
L	18	13,53	0,38
L	19	9,27	0,4
X	20	8,17	0,54
L	21	12,94	0,78

Tableau 7.1. Distances calculées entre groupements carbonyle dans le cas de trimères telles que déterminées par modélisation pour LX2 et LX2-Ac

acides aminés	¹³ C	distance moyenne (Å)	déviati on standard
L	1	10,76	1,45
X	2	8,69	0,86
L	3	11,25	0,67
L	4	12,91	0,54
L	5	9,32	0,38
X	6	8,62	0,42
L	7	12,36	0,39
L	8	11,19	0,33
X	9	7,63	0,31
L	10	10,64	0,34
L	11	12,50	0,36
L	12	9,09	0,28
X	13	8,30	0,29
L	14	12,16	0,35
L	15	11,20	0,34
X	16	7,68	0,35
L	17	10,67	0,4
L	18	12,71	0,49
L	19	9,27	0,56
X	20	8,45	0,68
L	21	12,11	0,92

Tableau 7.2. Distances calculées entre groupements carbonyle dans le cas de tétramères telles que déterminées par modélisation pour LX2 et LX2-Ac

La majorité des techniques de mesure de distances en RMN du carbone-13 permettent de calculer des distances de l'ordre de 5 Å. Le tableau ci-dessus permet de constater que les distances attendues en ¹³C est de l'ordre de 10 Å. Néanmoins, le CODEX permet de calculer des distances d'environ 10 Å avec le carbone-13 si on augmente les temps de mélange.

Tout d'abord, nous avons réalisé un spectre RMN ¹³C en rotation à l'angle magique afin d'identifier la position du pic du carbonyle marqué.

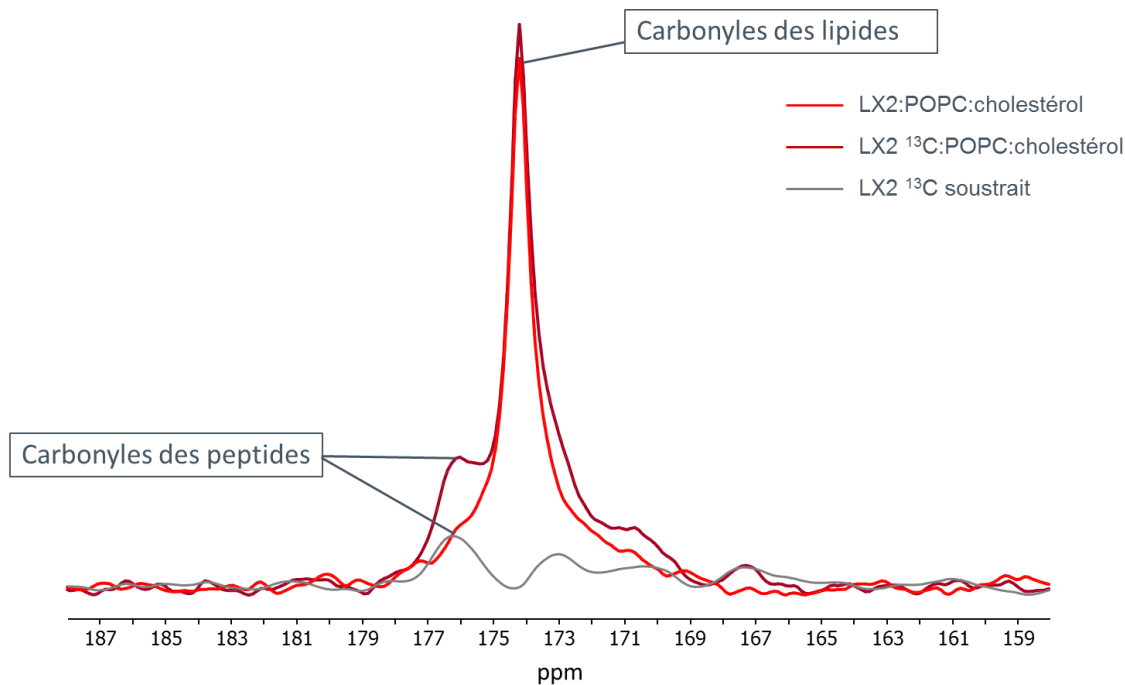


Figure 7.4. Spectre RMN ^{13}C en rotation à l'angle magique (5 000 Hz) dans des membranes modèles en présence du peptide LX2 en abondance naturelle (rouge); du peptide marqué (marron); spectre de soustraction (gris) entre le spectre avec et sans peptide marqué

La Figure 7.4 permet de constater que le pic des groupements carbonyle des lipides (174 ppm) interfère avec le pic des groupements carbonyle des peptides (176 ppm). De plus, malgré la faible abondance naturelle du ^{13}C , celui-ci est détecté notamment avec les chaînes des lipides qui possèdent beaucoup d'atomes de carbone. De plus, le rapport molaire P:L étant de 2:100 le signal du peptide n'est pas très intense. Afin de conserver seulement le pic de la leucine marquée au carbone-13, on procède à une soustraction du spectre de l'échantillon peptide:lipide en abondance naturelle. Le spectre de soustraction permet de constater que l'intensité n'est pas assez élevée pour effectuer une analyse CODEX. Il faut obtenir une intensité plus élevée afin de pouvoir observer la décroissance de S/S_0 sinon l'analyse ne peut pas être effectuée. Après avoir quadruplé le nombre de scans afin de doubler

l'intensité du signal, celui-ci était encore trop faible et n'a pas permis d'effectuer les analyses en CODEX.

Chapitre 8 : Conclusions

Les études présentées dans ce mémoire ont permis de déterminer, avec les analyses de CD et de la bande amide I' en IR, que les peptides LX2 et LX2-Ac possèdent tous les deux une structure majoritaire en hélice- α en présence de membranes modèles de types eucaryotes composés de POPC:cholestérol 80:20. En solution dans le HFIP, la structure en hélice- α reste prédominante mais les peptides adoptent en partie des structures plus désordonnées.

Les propriétés qui permettaient au peptide LS2 de s'incorporer ont bien été conservées avec les deux peptides fluorés, comme l'ont montré les études des bandes d'élongation symétriques des CH₂ ainsi que les bandes d'élongations des groupements carbonyle en spectroscopie IR. Ces résultats ont conduit à supposer que les deux peptides qui agissent de manière assez similaire ne s'incorporent pas tout à fait de la même manière. Les études des noyaux ³¹P, ²H et ¹⁹F en RMN confirme une incorporation différente des peptides. En effet les deux peptides ont un effet sur les têtes polaires visibles avec les spectres ³¹P. Ces résultats soutiennent ceux obtenus par modélisation moléculaire. Les études de RMN du ³¹P ont permis de mettre en évidence un effet sur la fluidité des vésicules et d'identifier une insertion du peptide au niveau des têtes polaires. Nous pouvons supposer qu'il y a une oligomérisation des peptides qui dépend de sa concentration comme il l'a été supposé avec les études de gradient de concentration en CD. Néanmoins la limite des études de RMN avec la séquence CODEX n'ont pas permis de confirmer de façon plus directe ce résultat mais ils ont permis de renforcer cette hypothèse d'oligomérisation qui a été suggérée par les études de modélisation. Une fois la méthode du CODEX optimisée, les mesures devront être faites sur les deux peptides.

8.1 Travaux en cours

Pour connaître le taux d'oligomérisation des peptides en RMN ¹³C, il va être nécessaire d'utiliser un spectromètre RMN avec un champ magnétique plus élevé (600 ou 900 MHz) afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, et de pouvoir détecter la décroissance.

Des études de RMN sont en cours afin d'observer les effets de l'augmentation de la concentration des peptides sur les membranes modèles de types eucaryotes. Pour le moment ces études ont seulement été réalisées sur le peptide LX2.

8.2 Travaux futurs

L'inconvénient de ce peptide est la difficulté de le solubiliser dans des solvants conventionnels en raison de l'augmentation de l'hydrophobicité due aux acides aminés fluorés¹⁵. Il n'a donc pas été possible de le purifier et le TFA n'a pas été complètement éliminé lors des triturations et lors de la lyophilisation. Il faudrait essayer d'enlever le TFA en effectuant de nouvelles triturations après la lyophilisation et procéder une nouvelle fois à une lyophilisation.

Si la formation d'oligomères est démontrée par des études CODEX, il serait intéressant d'utiliser des peptides possédant des acides aminés marqués près du N-terminal et du C-terminal afin de démontrer si l'oligomérisation se fait avec des hélices insérées de façon parallèle ou antiparallèle.

Nous avons renforcé l'hypothèse d'insertion des peptides dans les membranes. L'étude de l'angle d'insertion des peptides dans les membranes pourrait être un moyen d'expliquer les différents effets des deux peptides sur les lipides. Cette étude pourrait être réalisée par RMN en utilisant des bicouches orientées entre des plaques de verre.

Il serait intéressant de synthétiser de nouveaux peptides toujours sur le modèle du LS2, mais en remplaçant certaines sérines par des acides aminés monofluorés. Tout d'abord cela pourrait peut-être permettre de purifier le peptide. Cette étape est un élément important dans la production de peptides thérapeutiques. L'utilisation d'acides aminés monofluorés pourrait permettre d'étudier les peptides en RMN du fluor pour effectuer des mesures de distances et de diminuer les interactions intramoléculaires si les fluors sont à des positions assez éloignées.

De plus, les études ont été réalisées sur des modèles membranaires très simplifiés, Les membranes cellulaires étant plus complexes, l'utilisation de mélange de lipides pourrait apporter des modifications dans les interactions peptides-membranes. Ces peptides pourraient être testés avec des membranes plus complexes comme les *giant plasma membrane vesicles* (GPMV).

Chapitre 9 : Bibliographie

1. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R. & Fletcher, A. A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* **12**, 141–146 (1922).
2. Rendell, M. Insulin: moments in history. *Drug Dev. Res.* **69**, 95–100 (2008).
3. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatisky, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* **15**, 40–56 (2010).
4. Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F. G., Opicci, C. A., Heiligers, D., Hills, D., Calvo, X. R., Verhaert, P. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics* **4**, 58–69 (2014).
5. Leader, B., Baca, Q. J. & Golan, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 21–39 (2008).
6. Boohaker, R. J., Lee, M. W., Vishnubhotla, P., Perez, J. M. & Khaled, A. R. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. *Curr. Med. Chem.* **19**, 3794–3804 (2012).
7. De Groot, A. S. & Scott, D. W. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol.* **28**, 482–490 (2007).
8. Schellekens, H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin. Ther.* **24**, 1720–1740; discussion 1719 (2002).
9. Edmonds, M. & Peddie, V. Fluorinated Analogues of Biological Molecules: Accessing New Chemical, Physical and Biological Properties. *Chem. New. Zealand.* **70**, 85–87 (2006).
10. Yoshikawa, E., Fournier, M. J., Mason, T. L. & Tirrell, D. A. Genetically engineered fluoropolymers. Synthesis of repetitive polypeptides containing p-Fluorophenylalanine residues. *Macromolecules* **27**, 5471–5475 (1994).
11. Kokschi, B. & Gerling-Driessen, U. Fluorine meets peptides. *International innovation* 125–127 (2015).
12. Asante, V., Mortier, J., Wolber, G. & Kokschi, B. Impact of fluorination on proteolytic stability of peptides: a case study with α -chymotrypsin and pepsin. *Amino Acids* **46**, 2733–2744 (2014).
13. Sewald, N., Hollweck, W., Mütze, K., Schierlinger, C., Seymour, L. C., Gaa, K., Burger, K., Kokschi, B., Kokschi, B., Jakubke, H. D. Peptide modification by introduction of α -trifluoromethyl substituted amino acids. *Amino Acids* **8**, 187–194 (1995).
14. Kokschi, B., Sewald, N., Hofmann, H. J., Burger, K. & Jakubke, H. D. Proteolytically stable peptides by incorporation of α -Tfm amino acids. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **3**, 157–167 (1997).
15. Buer, B. C. & Marsh, E. N. G. Fluorine: a new element in protein design. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **21**, 453–462 (2012).
16. Chen, H., Viel, S., Ziarelli, F. & Peng, L. ^{19}F NMR: a valuable tool for studying biological events. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7971–7982 (2013).
17. Hong, M., Zhang, Y. & Hu, F. Membrane protein structure and dynamics from NMR spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 1–24 (2012).
18. Purser, S., Moore, P. R., Swallow, S. & Gouverneur, V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 320–330 (2008).

19. Borel, J.-P., Randoux, A., Maquart, F.-X., Le Peuch, C. & Valeyre, J. in *Biochimie Dynamique* 83–114 (Maloine Éditeur Paris, Déacrie Éditeur Montréal, 1987).
20. Godbout, R., Légaré, S., Auger, M., Carpentier, C., Otis, F., Auger, M., Lagüe, P., Voyer, N. Membrane assembly and ion transport ability of a fluorinated nanopore. *PLOS ONE* **11**, e0166587 (2016).
21. Lear, J. D., Wasserman, Z. R. & DeGrado, W. F. Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels. *Science* **240**, 1177–1181 (1988).
22. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochimie*. (2005).
23. Karp, G. *The Structure and Function of the Plasma Membrane. In Cell and Molecular Biology : Concepts and Experiments*. (John Wiley & Sons, Inc, 2010).
24. Robert, É., Lefèvre, T., Fillion, M., Martial, B., Dionne, J., Auger, M. Mimicking and Understanding the Agglutination Effect of the Antimicrobial Peptide Thanatin Using Model Phospholipid Vesicles. *Biochemistry (Mosc.)* **54**, 3932–3941 (2015).
25. Hahn, E. L. Spin Echoes. *Phys. Rev.* **80**, 580–594 (1950).
26. Bennett, A.E., Reinstra, C. M., Auger, M. Lakshmi, K. V. & Griffin, R. G. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys.* **103**, 6951–6958 (1995).
27. Davis, J. H., Jeffrey, K. R., Bloom, M., Valic, M. I. & Higgs, T. P. Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chem. Phys. Lett.*, **42**, 390–394 (1976).
28. Fukuyama, Y., Nakajima, C., Furuichi, K., Taniguchi, K., Kawabata, S. I., Izumi, S., & Tanaka, K. Alkylated trihydroxyacetophenone as a MALDI matrix for hydrophobic peptides. *Anal. Chem.* **85**, 9444–9448 (2013).
29. Rusconi, F. *Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes*. (Lavoisier, 2011).
30. Bruker Guide MALDI Sample Preparation Rev2 | Solution | Solvent. *Scribd* Available at: <https://fr.scribd.com/doc/206452323/Bruker-Guide-MALDI-Sample-Preparation-Rev2>. (Consulté le 3 juillet 2015)
31. Circular Dichroism (CD) Spectroscopy | Applied Photophysics. Available at: <https://www.photophysics.com/resources/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy>. (Consulté le 16 avril 2017)
32. Miles, A. J. & Wallace, B. A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 4859–4872 (2016).
33. Malavolta, L., Pinto, M. R. S., Cuvero, J. H. & Nakaie, C. R. Interpretation of the dissolution of insoluble peptide sequences based on the acid-base properties of the solvent. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **15**, 1476–1488 (2006).
34. Pubchem. cholesterol | C₂₇H₄₆O - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cholesterol>. (Consulté le 17 avril 2017)
35. Freire, E. Thermal denaturation methods in the study of protein folding. *Methods Enzymol.* **259**, 144–168 (1995).
36. Rose, G. D., Gierasch, L. M. & Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **37**, 1–109 (1985).
37. Dong, A., Matsuura, J., Manning, M. C. & Carpenter, J. F. Intermolecular beta-sheet results from trifluoroethanol-induced nonnative alpha-helical structure in beta-sheet predominant proteins: infrared and circular dichroism spectroscopic study. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 275–281 (1998).
38. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1767**, 1073–1101 (2007).

39. Singh, B. R. in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins* **750**, 2–37 (American Chemical Society, 1999).
40. Krimm, S. in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins* **750**, 38–53 (American Chemical Society, 1999).
41. Lewis, R. N. A. H. & McElhaney, R. N. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2347–2358 (2013).
42. Afonin, S., Glaser, R. W., Berditchevskaia, M., Wadhvani, P., Gührs, K. H., Möllmann, U., Perner, A., Ulrich, A. S. 4-fluorophenylglycine as a label for ^{19}F NMR structure analysis of membrane-associated peptides. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **4**, 1151–1163 (2003).
43. Auger, M. Biological membrane structure by solid-state NMR. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**, 119–124 (2000).
44. Auger, M. Structural and Dynamics Studies of Lipids by Solid-State NMR. In *solid-state NMR studies of biopolymers*; (eds. McDermott, A. E., Polenova, T.), (John Wiley & Son, 2010)
45. Chan, J. C. C. *Solid State NMR*. (Springer Science & Business Media, 2011).
46. Davis, J. H., Auger, M. & Hodges, R. S. High resolution ^1H nuclear magnetic resonance of a transmembrane peptide. *Biophys. J.* **69**, 1917–1932 (1995).
47. Buffy, J. J., Waring, A. J. & Hong, M. Determination of peptide oligomerization in lipid bilayers using ^{19}F spin diffusion NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4477–4483 (2005).
48. Chan, J. J. C. & Tycko, R. Recoupling of chemical shift anisotropies in solid-state NMR under high-speed magic-angle spinning and in uniformly ^{13}C -labeled systems. *J. Chem. Phys.* **118**, 8378–8389 (2003).
49. deAzevedo, E. R., Hu, W.-G., Bonagamba, T. J. & Schmidt-Rohr, K. Centerband-Only Detection of Exchange: Efficient Analysis of Dynamics in Solids by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8411–8412 (1999).
50. Luo, W. & Hong, M. Determination of the oligomeric number and intermolecular distances of membrane protein assemblies by anisotropic ^1H -driven spin diffusion NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7242–7251 (2006).
51. Hong, M. Oligomeric structure, dynamics, and orientation of membrane proteins from solid-state NMR. *Structure* **14**, 1731–1740 (2006).