

N° d'ordre : 4133

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Vanessa ZHENDRE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE-PHYSIQUE

Etude de l'implication des Phosphoinositides dans la formation de l'enveloppe nucléaire

Soutenue le 13 décembre 2010

Après avis de :

M. Felix M. GONI, **Professeur l'Université de Bilbao**
M. Burkhard BECHINGER, **Professeur de l'Université de Strasbourg I**

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Felix M. GONI, **Professeur l'Université de Bilbao**
M. Burkhard BECHINGER, **Professeur de l'Université de Strasbourg I**
M. Jean-Marie SCHMITTER, **Professeur de l'Université de Bordeaux I**
Mme Chrystel FAURE, **Professeur de L'Institut Polytechnique de Bordeaux**
Mme Banafshé LARIJANI, **Directeur de Recherche Cancer Research UK**
M. Erick J. Dufourc, **Directeur de Recherche CNRS**

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

A mon neveu Raphaël,

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut Européen de Chimie et Biologie à Pessac dans l'UMR-CBMN 5248. Je tiens donc à remercier messieurs Jean-Jacques Toulmé et Ivan Huc, co-directeurs de l'institut, ainsi que Erick J. Dufoure, directeur de l'UMR, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail ; M. Felix M Goñi et M. Bürkhard Bechinger pour avoir pris le temps de juger mon manuscrit en qualité de rapporteurs, M. Jean-Marie Schmitter pour avoir accepté de présider ce jury et enfin Mme Chrystel Faure pour ses remarques pertinentes. J'ai réellement apprécié d'échanger avec vous sur mes travaux de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à mes deux directeurs de thèses, Erick J. Dufourc et Banafshé Larijani pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes respectives et surtout de m'avoir fait confiance. J'ai énormément appris à vos côtés... Erick; Merci de m'avoir laissé autant d'autonomie pour découvrir par moi-même le monde de la recherche (à savoir planifier ses manips, la joie d'obtenir de bons résultats, les doutes lorsque ça ne marche pas, les congrès, la rédaction d'articles, la satisfaction de constater tout ce qu'on a fait et appris une fois la rédaction terminée), tout en étant présent lorsque c'était nécessaire... Avec toi, la théorie de la RMN devient presque facile... Banafshé; Merci pour ton enthousiasme (passion) pour la recherche, tu es un remontant puissant contre les petites baisses de motivation. La confiance, que tu m'as témoignée, m'a énormément aidée à combattre mes doutes. Un grand merci aussi pour ton soutien pendant la rédaction, où nos RDV téléphoniques ont été très bénéfiques.

Je tiens également à remercier mes collègues de l'équipe RMN à Bordeaux et de l'équipe Cells Biophysics à Londres. Dans ces deux laboratoires, j'y ai apprécié la solidarité ainsi que la très bonne ambiance générale, qui ont fait que ce fut un réel plaisir de travailler avec vous tous. Axelle ; un grand merci à toi pour ta grande disponibilité, pour ta gentillesse et ta bonne humeur. J'ai réellement apprécié de travailler et d'apprendre la RMN avec toi. Sébastien ; Merci d'avoir répondu à toutes mes questions de RMN du solide et de m'avoir initiée à RMN friend. Merci pour ta gentillesse, et ta bonne humeur. J'ai passé également de très bons moments en dehors du labo, lors de soirée, mariage and co... Anna ; je n'oublierais jamais ces années passées avec toi. Merci pour ta passion pour les sciences, pour ta gentillesse, pour ta grande joie de vivre (à toutes épreuves), et pour ton regard d'enfant sur les choses. Merci également pour ton fort soutien lors des moments difficiles et nos supers moments hors labo. Olivier ; contente d'avoir fait le sprint final en ta compagnie. Travailler avec toi fut très agréable du fait de ta gentillesse et de ta bonne humeur permanente... Christian ; contente d'avoir fait ta connaissance et d'avoir partagé tes dernières années de thèse... Jeannot ; Allez courage, il ne reste plus que toi de notre génération. J'ai eu de nombreux fous rires grâce à toi entre ta danse africaine dans les bureaux, tes siestes, et ton RIRE. Merci pour tout ça...Cécile; j'ai eu l'occasion de te voir soutenir au tout début de ma thèse et de te voir revenir dans ma dernière année. Merci pour nos discussions et ton soutien pendant la rédaction. Je remercie également tous les membres permanents avec qui j'ai pu échanger : Benoît (merci pour tes conseils), Julie et Isabelle, ainsi que les stagiaires que j'ai eu l'occasion de croiser aux cours de ces années : Adeline, André (notre canadienne légendaire), Denis (le futur thésard de Benoît ???), Aurélien (Bon courage pour les 3 années à venir).

Je souhaite également remercier tous mes collègues du laboratoire de Cell Biophysics à Londres. Merci à vous tous de m'avoir bien accueillie lors de mes séjours à Londres. Je

remercierai plus particulièrement Richard et Marie, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler; Merci pour votre disponibilité pendant ma thèse (réponse à toutes mes questions par email, discussions NERs, formation fabrication des MV0s et extraction des lipides...). Je remercie très sincèrement le Pr. D. Poccia pour avoir toujours suivi mon travail de près, ainsi que pour ses encouragements.

Je suis très reconnaissante envers O.Lambert et P. Bonnafous pour avoir accepté de collaborer sur ce projet en nous ouvrant les portes de la microscopie électronique et par conséquent de nous avoir permis de visualiser les objets formés par ces fameux lipides que sont les phosphoinositides.

Je tiens à remercier maintenant tous les gens que j'ai eu l'occasion de rencontrer et de côtoyer à l'IECB que ce soit autour de discussions scientifiques, des repas du midi en salle de pause ou encore lors de soirées. Ce fut un réel plaisir de travailler dans cet institut... J'aurai des pensées plus particulières pour Mélanie (merci pour ces supers souvenirs de début et de fin de thèse), Céline (beau parcours depuis notre licence), Cécile M., Simon (tu me fais trop rire...), Delphine (de supers souvenirs, merci...), Marisa, Xavier, Gildas, Anne-Laure, Julien, Sabine, Aurélie.

Comment ne pas maintenant remercier mes amis pour leur amitié et leur soutien, sans qui ces années n'auraient pas été pareilles. Je tiens dans un premier temps à remercier Maria et Thomas. Merci à vous deux d'avoir été à mes côtés pendant toute ma thèse, et notamment lors des moments difficiles. Merci aussi pour tous ces moments géniaux. Je n'oublierais pas... Maria ; un grand merci tout particulier. Je te remercie de ta gentillesse, de ta joie de vivre, de ton écoute, et de m'avoir si bien comprise... Ensuite, j'ai eu l'occasion de rencontrer Fred et Jone, grande rencontre là-encore. Fred ; je suis fan de ta spontanéité, de ta joie de vivre, de ton énergie, et de ton sens de faire la fête. J'ai passé des moments supers avec toi et j'espère qu'il y en aura pleins d'autres... Jone ; j'ai adoré discuter avec toi cigarettes (alors cette fois, c'est la bonne ???), kilos, sport bref de tout sauf de sciences (mais qu'est-ce que ça fait du bien). Tu m'as toujours fait mourir de rire, et j'ai également passé de supers moments avec toi. Merci à toutes les deux d'avoir été là pour ma préparation de soutenance, ça m'a beaucoup aidé d'être soutenue par vous (et oui je stressais beaucoup beaucoup). Je remercie également mes amis qui ont suivi cette aventure de loin... Un grand merci à Marie, mon amie qui me suit depuis la seconde. Que de chemins parcourus des deux côtés quand j'y pense. Merci d'avoir été là pour écouter mes plaintes de thésarde et encore plus pendant la rédaction... Je remercie également Claire : nous avons fait notre thèse ensemble mais pas dans le même pays. Contentée d'avoir partagée ce moment avec toi et ce fut bien pratique nos discussions msn ou visite express lors de coup de stress, de démotivation ou encore pendant la rédaction. Une pensée pour Kénou qui m'a toujours encouragée et qui, bien que non scientifique, a eu le courage de venir à ma soutenance. Merci, ça m'a énormément touchée...

Je tiens enfin à adresser ma plus profonde reconnaissance à toute ma famille, qui m'a toujours soutenue et conseillée lors des périodes de doutes (même si ce fut pas toujours facile). Je pense à ma sœur, Florian, Raphaël (eh oui tu m'as beaucoup aidée à ta façon), mes grands-parents et plus fortement encore à mes parents (vraiment merci à vous deux). Maintenant je tiens à remercier tout particulièrement François : merci d'avoir toujours été à mes cotés pendant ces trois ans (même si je t'en ai fait voir de toutes les couleurs). Ta présence m'a vraiment été d'un grand soutien et a été une bouffée d'oxygène. Merci également d'avoir pris presque tout en charge pendant mes mois de rédaction et ce malgré un travail très prenant de ton côté aussi. Enfin, je remercie ma petite crevette, qui même si je ne connaissais pas encore son existence, était déjà là pour me soutenir lors de ma soutenance de thèse.

Sommaire

Abréviations

Avant-propos

Production scientifique

I. Introduction générale

I.1 Les membranes naturelles..... 3

- I.1.1 Structure et composition des membranes 3
- I.1.2 Rôle des membranes..... 8
- I.1.3 Les membranes modèles..... 8

I.2 L'enveloppe nucléaire..... 13

- I.2.1 Structure et dynamique de l'enveloppe nucléaire 13
- I.2.2 Les envelopathies nucléaires 16

I.3 Formation du pronoyau comme modèle d'étude pour la formation de l'enveloppe nucléaire 17

- I.3.1 Formation *in vitro* de l'enveloppe nucléaire..... 21
- I.3.2 La formation de l'enveloppe implique des processus de fusion membranaire 29
- I.3.3 Etat des lieux des connaissances sur les phosphoinositides..... 37

I.4 Objectifs et plan de thèse..... 45

II. Techniques physico-chimiques utilisées

II.1 Préparation des modèles membranaires..... 47

II.2 La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) appliquée aux biomembranes 48

- II.2.1 Principes généraux de la résonance magnétique nucléaire 48
- II.2.2 La RMN des biomembranes 52
- II.2.3 La théorie de l'échange à deux sites 63
- II.2.4 Description générale d'une expérience de RMN 65
- II.2.5 Traitement des données 70

II.3 La cryomicroscopie électronique..... 74

II.3.1 Historique	74
II.3.2 Fonctionnement général de la microscopie électronique à transmission	75
II.3.3 Formation de l'image	76
II.3.4 Préparation d'échantillons pour la microscopie électronique à transmission	77

III. Polymorphisme des Phosphoinositides (PPIs) en fonction du pH et de la température

III.1 Introduction 81

III.2 Les paramètres d'acquisition des expériences de RMN..... 81

III.2.1 Les paramètres pour la RMN du phosphore	81
III.2.2 Les paramètres pour la RMN du deutérium.....	83

III.3 Etude par RMN du phosphore du polymorphisme des phosphoinositides en fonction du pH et de la température..... 83

III.3.1 Polymorphisme du Phosphatidylinositol (PI).....	83
III.3.2 Polymorphisme du phosphatidylinositol-4-monophosphate (PIP)	87
III.3.3 Polymorphisme du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP ₂).....	92
III.3.4 Polymorphisme du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP ₃).....	99

III.4 Etude de la dynamique de dispersions aqueuses de PPIs par RMN du deutérium..... 99

III.4.1 Spectres de RMN du deutérium des dispersions aqueuses des PPIs en fonction du pH et de la température.....	101
--	-----

III.5 Etude par cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de phosphoinositides 108

III.5.1 Dispersions aqueuses de PI à pH 7,2	109
III.5.2 Dispersions aqueuses de PIP à pH 4,8 et à pH 7,2	110
III.5.3 Dispersions aqueuses de PIP ₂ à pH 4,8 et à pH 7,2	116

III.6 Discussion..... 118

III.6.1 Morphologies des membranes constituées de PPIs	121
III.6.2 Dynamique des membranes riches en PPIs	125
III.6.3 Implications biologiques.....	127

III.7 Conclusion..... 128

IV. Etude des vésicules membranaires MV1, riches en phosphoinositides, essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire

IV.1 Introduction 129

IV.2 Choix et préparation des modèles membranaire 129

IV.2.1 Le modèle « MV1 » 131

IV.2.2 Le Modèle « MV2 » 131

IV.2.3 Les modèles constitués de lipides issus des membranes naturelles MV0s 131

IV.3 Les paramètres d'acquisition des expériences de RMN 134

IV.3.1 Les paramètres pour la RMN du deutérium 134

IV.3.2 Les paramètres pour la RMN du phosphore 134

IV.4 Etude de modèles membranaires mimant la composition lipidique des vésicules MV1 134

IV.4.1 Etudes par RMN du deutérium 136

IV.4.2 Etude par RMN du phosphore-31 151

IV.5 Etude d'un modèle membranaire mimant la composition lipidique des vésicules MV2 157

IV.5.1 Etude par RMN du deutérium 157

IV.5.2 Etude par RMN du phosphore-31 160

IV.6 Etude préliminaire sur les membranes naturelles 163

IV.6.1 Etude par RMN du deutérium des systèmes MV0s et MV0s+PI-PLC 165

IV.6.2 Etude par RMN du phosphore 166

IV.7 Discussion 167

IV.7.1 Propriétés structurales et de dynamiques de membranes enrichies en phosphoinositides 169

IV.7.2 Implications biologiques des résultats 175

IV.8 Conclusion 176

V. Etudes des portions rémanentes de l'enveloppe nucléaire (NERs), riches en cholestérol et en phosphoinositides, essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire

V.1 Introduction 177

V.2 Choix et préparation des modèles membranaires	179
V.3 Les paramètres d'acquisition des expériences de RMN.....	180
V.3.1 Les paramètres pour la RMN du deutérium.....	180
V.3.2 Les paramètres pour la RMN du phosphore	180
V.4 Etude de l'effet du cholestérol et des phosphoinositides sur les propriétés membranaires des NERs.....	180
V.4.1 Etude par RMN du deutérium	181
V.4.2 Etude par RMN du phosphore-31	189
V.5 Discussion.....	197
V.5.1 Propriétés biophysiques de membranes enrichies en phosphoinositides et en cholestérol	198
V.5.2 Implications biologiques.....	203
V.6 Conclusions	204

VI. Implications Biologiques et Conclusions Générales

VI.1 Introduction	207
VI.2 Les NERs, essentiels à l'arrimage des vésicules MV1 et MV2, sont des membranes en phase liquide ordonnée	209
VI.3 Les PPIs peuvent faciliter les mécanismes de fusion membranaire en agissant sur la dynamique et la courbure membranaire	211
VI.3.1 Les MV1 sont des membranes très fluides, favorisant leur interaction avec les NERs	211
VI.3.2 L'enrichissement en PPIs dans MV1 et NERs prépare les membranes aux processus de fusion .	213
VI.3.3 La présence desPPIs dans MV1 et NERs permettrait de stabiliser l'ouverture du pore de fusion.....	215
VI.3.4 Rôle des MV2 dans la formation de l'enveloppe nucléaire	215
VI.4 Conclusion Générale et perspectives.....	216

Références

Abréviations

^2H : noyau deutérium

^{31}P : noyau phosphore

$\Delta\sigma$: Anisotropie de déplacement chimique

AA : Acide Arachidonique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AO : Acide Oléique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDK2 : Kinase dépendante à la cycline (« Cyclin-Dependent Kinase »)

Chol : Cholestérol

CMC : Concentration Micellaire Critique

CP-MAS : Polarisation Croisée avec Rotation à l'Angle Magique (« Cross-polarization Magic Angle Spinning »)

DAG : Diacylglycérol (produit de l'hydrolyse de PIP_2 par $\text{PLC}\gamma$)

DMPC : DiMyristoyl-PhosphatidylCholine (C14:0-C14:0 PC)

DPPC : DiPalmitoyl-PhosphatidylCholine (C16:0-C16:0 PC)

HR-MAS : Haute Résolution par rotation à l'angle magique (« High-Resolution Magic Angle Spinning »)

EN : Enveloppe Nucléaire

FID : (« Free Induction Decay »)

GCE : Gradient de Champ Electrique

GUVs : vésicules unilamellaires géantes (« Giant Unilamellar Vesicles »)

HPLC-ESI-MS/MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à une ionisation par électrospray suivie de spectrométrie de masse en tandem

InsP_3 : Inositol TriPhosphate (produit de l'hydrolyse de PIP_2 par $\text{PLC}\gamma$)

$\text{L}\alpha$: Phase Lamellaire Fluide

$\text{L}\beta$: Phase Lamellaire Gel

LAP1/2: Polypeptides associés aux lamines A

LB: (« Line Broadening »)

LBR: Récepteur à Lamine B (protéines intégrales de la membrane nucléaire interne capables d'accrocher la lamina et la chromatine à la membrane)

LMNA: Lamines A

LPC : Lyso-PhosphatidylCholine

LUVs : vésicules unilamellaires larges (« Large Unilamellar Vesicles »)
lo: phase liquide ordonnée

M₁: Moment spectral d'ordre 1

MLVs : Vésicules MultiLamellaires («MultiLamellar Vesicles»)

MV0s : Vésicules Membranaires issues du cytoplasme de l'œuf fécondé

MV1 : Vésicules Membranaires 1

MV2 : Vésicules Membranaires 2

NERs : portion rémanente de l'enveloppe nucléaire (« Nuclear Envelope Remnants »)

P3, P4, P5 : phosphomonoester sur le cycle inositol des PPIs se situant en position 3, 4 ou 5

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphatidylEthanolamine

PG: PhosphatidylGlycérol

pH : Potentiel Hydrogène

PH domaine : domaine homologue à la pleckstrine (« Pleckstrin Homology »)

PKC : Protéine Kinase C

PI: PhosphatidylInositol

PIP: PhosphatidylInositol monophosphate

PIP₂: PhosphatidylInositol biPhosphate

PIP₃: PhosphatidylInositol triPhosphate

PLC: PhosphoLipase de type C

POPC: Palmitoyl-Oleoyl-PhosphatidylCholine (C16:0-C18:1 PC)

POPC_{d31} : POPC deutéré

PPIs: PolyPhosphoInositides

PS: PhosphatidylSérine

RE : Réticulum Endoplasmique

RMN: Résonance de Magnétique Nucléaire

S_{CD}: Paramètre d'ordre de la liaison CD

SEM: Erreur standard sur la moyenne (« Standard Error Mean »)

SUVs : vésicules unilamellaires de petites tailles (« Small Unilamellar Vesicles »)

T_m : Température de transition de phase

Avant-propos

La formation de l'enveloppe nucléaire est un processus complexe qui se produit lors de chaque division cellulaire et également lors de la fécondation. Il y a de plus en plus de preuves que des mécanismes défailants lors de la formation de l'enveloppe nucléaire engendreraient des pathologies graves comme des myopathies ou des cancers. Par conséquent, une bonne compréhension de ces mécanismes apparaît nécessaire, afin de comprendre l'origine de ces maladies. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte.

L'étude *in vivo* de la formation de l'enveloppe nucléaire s'est avérée extrêmement complexe. Pour pallier ces difficultés, plusieurs systèmes modèles permettant l'étude de ce processus ont été développés. Ces systèmes *in vitro* se sont révélés très puissants et ont permis de nombreuses avancées dans la compréhension de ces mécanismes. Celui dérivant de gamètes d'oursins représentent le meilleur modèle d'étude de l'enveloppe nucléaire. A l'aide de ce système, il a été observé que la formation de l'enveloppe nucléaire se fait de manière séquentielle et impliquerait des processus de fusion membranaire. Lors de cette étude, nous nous sommes concentrés sur le rôle des lipides lors de la formation de l'enveloppe nucléaire et plus particulièrement le rôle des phosphoinositides (PPIs). En effet, deux populations de membranes essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire sont fortement enrichies en PPIs (60% molaire des phospholipides). Du fait de la présence en forte concentration des PPIs dans ces membranes, il est apparu pertinent d'étudier leur rôle sur la structure et la dynamique membranaire, paramètres pouvant influencer sur les processus. Ce travail a donc consisté à construire des modèles membranaires mimant la composition lipidique de ces membranes essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire, puis d'étudier la structure et la dynamique de ces modèles par RMN des solides et par microscopie électronique.

Il est important de mentionner que ce travail n'aurait pas été possible sans le partage des compétences entre le laboratoire de Biophysique Cellulaire (Cancer Research UK, London research Institute) dirigé par B. Larijani à Londres et le laboratoire Structure et Dynamique des assemblages membranaire (UMR5248, Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets : CBMN) dirigé par E.J. Dufourc à Pessac (33).

Production Scientifique

Ce travail a fait l'objet d'un certain nombre de publications et de communications :

Publications

- ❖ **Nuclear membrane fusion: key role of polyphosphoinositides in adjusting complementary dynamics of precursor membranes**, 2010
Vanessa Zhendre, Axelle Grélard, Marie Garnier-LHomme, Sébastien Buchoux, Banafshé Larijani, Erick J Dufourc.
Submitted to FASEB Journal
- ❖ **Nuclear Envelope Formation In Vitro: A Sea Urchin Egg Cell-Free System**, 2009
Richard D. Byrne, Vanessa Zhendre, Banafshé Larijani and Dominic L. Poccia.
Methods in Molecular Biology, 2009, Volume 464, III, 207-223.
- ❖ **PLC γ is enriched on poly-phosphoinositide-rich vesicles to control nuclear envelope assembly**, 2007
Richard D. Byrne, Marie Garnier-Lhomme, Kevin Han, Michael Dowicki, Nick Michael, Nick Totty, Vanessa Zhendre, Aeri Cho, Trevor R. Pettitt, Michael J. Wakelam, Dominic L. Poccia, Banafshé Larijani.
Cellular Signalling, 2007, Volume 19, 913–922.

Communications

I. Poster

- ❖ **Role of lipids in Nuclear Membrane Fusion**, 2008.
Vanessa Zhendre, Banafshé Larijani and Erick Dufourc
5ème congrès de lipidomique du Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique, Compiègne, France. **Prix du meilleur poster**
- ❖ **Role of lipids in Nuclear Membrane Fusion**, 2008.
Vanessa Zhendre, Banafshé Larijani and Erick Dufourc
Congrès du Groupe d'Etude des Interactions Molécules-Membranes, Mittelwhir, France.

II. Présentation orale

- ❖ **Role of Phosphoinositides in Nuclear Membrane Assembly**, 2009.
Vanessa Zhendre, Banafshé Larijani and Erick Dufourc
European Biophysics Congress Genoa, Gênes, Italie.

I. Introduction générale

Les membranes sont capitales pour l'intégrité de la cellule. Elles permettent une séparation entre la cellule et le milieu extracellulaire, cas de la membrane plasmique, et entre les différents organites au sein même de la cellule, cas des membranes intracellulaires. Les membranes constituent un milieu organisé complexe. Ce chapitre d'introduction a pour but de présenter les membranes naturelles dans leur globalité puis nous décrirons l'enveloppe nucléaire, double membrane qui nous a plus particulièrement intéressé dans le cadre de cette thèse. Nous introduirons ensuite des modèles *in vitro* permettant l'étude des mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire. Nous montrerons dans quelles mesures ces modèles ont permis une meilleure compréhension de ces mécanismes. Enfin, nous présenterons les objectifs et le plan de cette thèse.

I.1 Les membranes naturelles

I.1.1 Structure et composition des membranes

Toutes les cellules sont constituées de membranes plasmiques et intracellulaires (Figure I-1). Ces membranes ont une structure et une composition bien particulière qui leur confèrent leurs propriétés. Elles sont la résultante d'un édifice supramoléculaire composé principalement de lipides et de protéines.

De nombreux modèles représentant la structure et la dynamique des membranes naturelles se sont succédés. En 1935, un premier modèle dit de « sandwich » a été proposé par Danielli et Davson (Danielli et Davson, 1935). Dans ce modèle, le concept de bicouche lipidique est déjà présent et les protéines recouvrent les deux surfaces de la bicouche à la manière d'un sandwich. Après quelques modifications du précédent modèle, le concept de « mosaïque fluide » est apparu dans les années 70, d'abord proposé par Bothorel et Lussan puis développé par Singer et Nicolson (Bothorel et Lussan, 1970 ; Singer et Nicolson, 1972). Le terme « mosaïque » traduit l'hétérogénéité à la fois dans l'espace et le temps de la membrane et le terme « fluide » signifie que les espèces membranaires diffusent dans le plan de la membrane. Au cours de ces dernières années, la vision de « mosaïque fluide » a évolué, notamment avec la découverte de microdomaines lipidiques, encore appelés « raft » (radeaux) (Figure I-2) (Simons and Ikonen, 1997). Ces régions riches en cholestérol et sphingolipides présenterait une rigidité plus importante que le reste de la membrane ainsi qu'une composition en protéines bien spécifique (Simons et Ikonen, 1997 ; Edidin, 2003 ; McMullen et al., 2004 ; Dufourc, 2008 ; Pike, 2009).

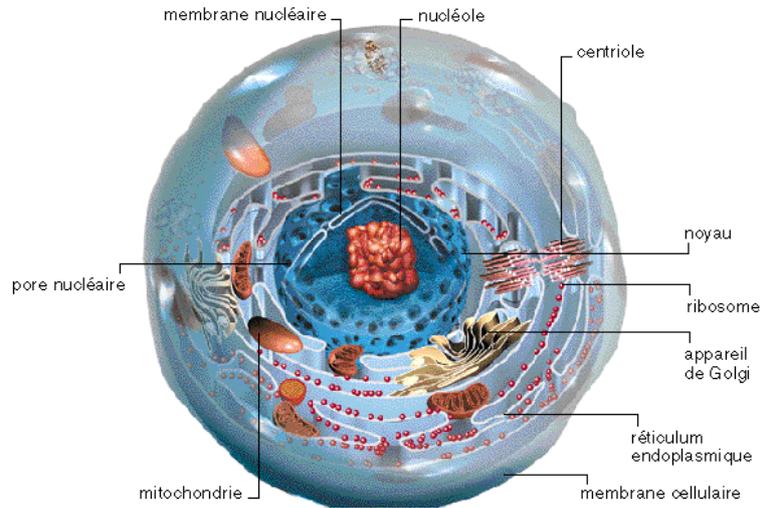
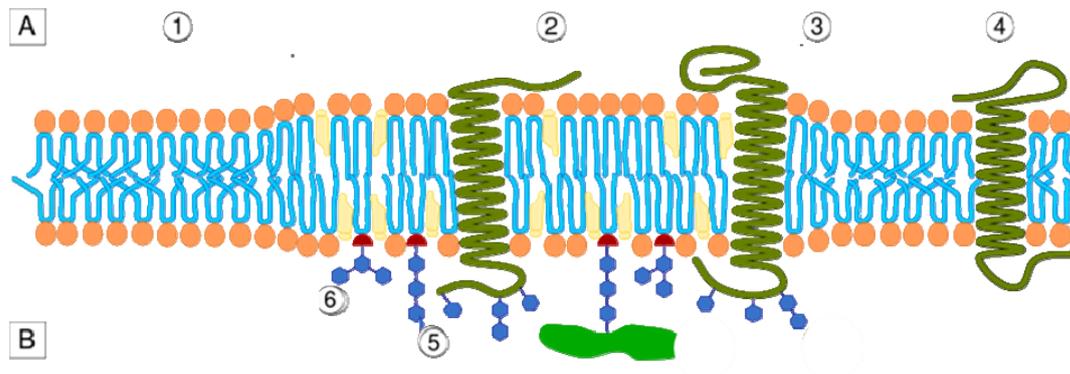


Figure I-1 Représentation d'une cellule (Kermaïdic, 2001). Chaque entité de la cellule est délimitée par une membrane.



- A. Cytosole
- B. Espace extracellulaire
- 1. Membrane « normale »
- 2. « Lipid raft »
- 3. Protéines membranaires associées au « lipid raft »
- 4. Protéines membranaires
- 5. Cholestérol
- 6. Glycolipides

Figure I-2 Architecture moléculaire d'une membrane biologique selon le modèle « mosaïque fluide » avec « raft » (adapté d'après Simons et Ikonen, 1997).

Ces propriétés biologiques particulières confèreraient aux « rafts » un rôle privilégié dans de nombreux processus au niveau de la membrane (Simons et Ikonen, 1997 ; Jacobson et Dietrich, 1999 ; Brown et London, 2000 ; Edidin, 2003 ; Rajendran et Simons, 2005).

a) Les lipides membranaires

Les lipides sont des molécules amphiphiles ou amphipatiques constituées d'une tête polaire hydrophile et d'une partie hydrophobe. Ils ont la particularité de s'auto-assembler dans l'eau de manière à maximiser les interactions hydrophobes et hydrophiles. La structure en bicouche est celle que l'on retrouve le plus couramment, avec une partie apolaire au centre où l'eau n'a pas accès et une partie polaire de part et d'autre de la bicouche en contact avec le milieu aqueux. Il existe une très grande variété de lipides, présentant eux-mêmes une grande diversité dans la structure de la tête polaire et de la partie hydrophobe (Schechter, 1990 ; Cullis et al., 1996).

Les 1,2-diacylphosphoglycérides ou phospholipides sont formés à partir d'un glycérol sur lequel une ou deux chaînes d'acide gras sont liées par liaison ester (position 1 et 2 du glycérol). Un groupement phosphate rattaché par lien éther au glycérol (en position 3) constitue la base de la tête hydrophile qui est complété par un groupement polaire, chargé ou non (choline, éthanolamine, inositol, ...) (Figure I-3a). Il existe également un grand nombre d'acide gras : longueur de chaînes et nombre d'insaturations variables. Ceci conduit à une multitude de phospholipides pouvant être formés. Les phospholipides représentent la classe de lipides la plus abondante retrouvée dans les membranes biologiques. Chez les procaryotes (les bactéries *Escherichia coli* par exemple), le phospholipide majoritaire est le plus souvent la phosphatidyléthanolamine (PE), alors que chez les eucaryotes, nous retrouvons en majorité la phosphatidylcholine (PC) (Tableau I-1).

Les stéroïdes dérivent d'un noyau cyclopentanophénanthrémique (tétracycle saturé) avec un groupement hydroxyle en position C3 pour les stérols. Le cholestérol est le stérol que l'on retrouve majoritairement chez les mammifères (Figure I-3b). Chez les champignons, l'ergostérol constitue le stérol principal. Cette classe de lipides se trouve en quantité non négligeable dans les membranes (de 0 à 50%) et représente la deuxième grande classe de lipides membranaires.

Les sphingolipides sont des lipides complexes, dérivés de la molécule de sphingosine. Ils résultent de l'amidification d'un acide gras sur une sphingosine. Sur la fonction alcool primaire de la sphingosine peuvent s'ajouter différents substituants.

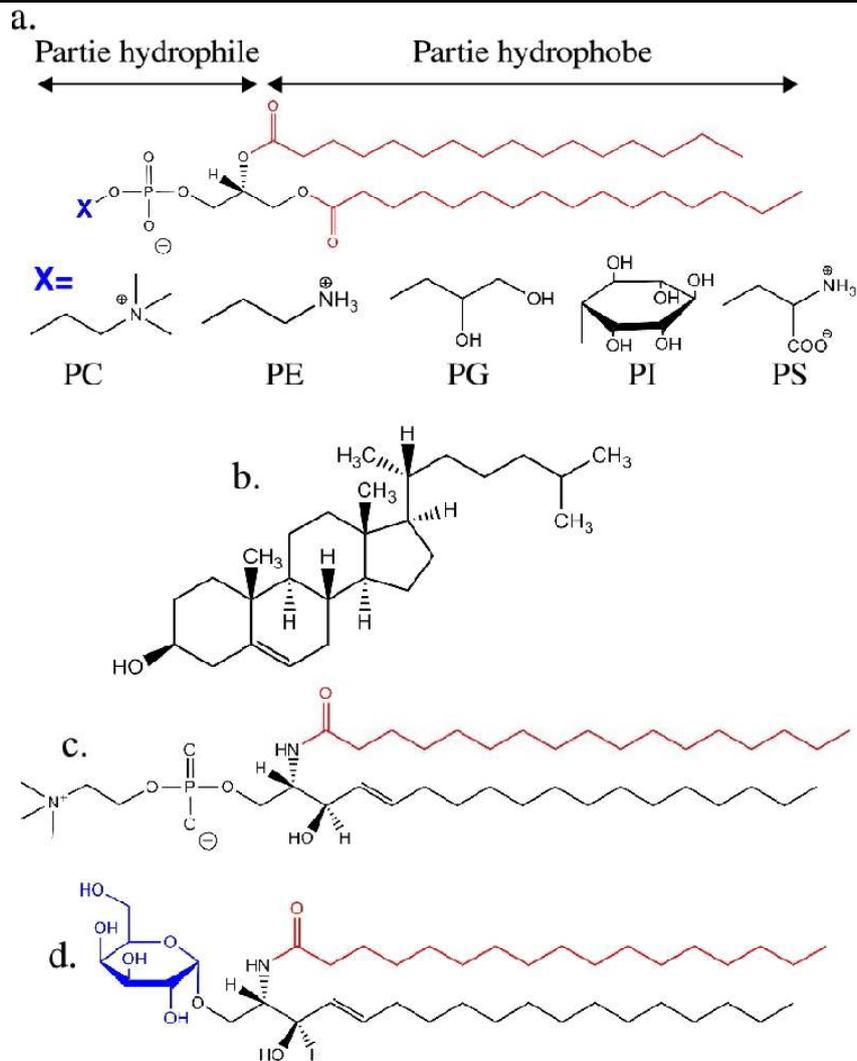


Figure I-3 Structure des différentes classes de lipides membranaires : les phosphoglycérol (a.), le cholestérol (b. stérol), la sphingomyéline (c. sphingolipide) et le galactocérebroside (d. glycolipide). En bleu sont représentées les parties variables pour les têtes polaires et en rouge les parties variables pour les parties hydrophobes. Pour les phosphoglycérols, différents substituants peuvent venir se lier au groupement phosphate : la choline (PC), l'éthanolamine (PE), le glycérol (PG), l'inositol (PI) et la sérine (PS)

	Myéline	Erythrocyte	Mitochondrie	Microsome	E.Coli
Cholestérol	25	25	5	6	0
Phospholipides totaux	32	56	95	94	100
dont PE	14	20	28	17	80
PS	7	11	0	0	0
PC	11	23	48	64	0
PI	0	2	8	11	0
PG	0	0	1	2	15
diPG	0	0	11	0	5
Sphingolipides totaux	32	18	0	0	0
Autres	11	1	0	0	0

Tableau I-1 Composition lipidique de différentes membranes (en % de la quantité totale de lipides). PE, PS, PC, PI, PG : phosphatidyl-éthanolamine, sérine, choline, inositol, glycérol ; diPG : cardiolipide (Schechter, 1990).

En fonction de la nature du substituant, on distingue notamment les céramides, les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides. Par exemple, les sphingomyélines (phosphosphingolipides) sont formés par l'assemblage de la sphingosine, liée à un acide gras par une liaison amide et de la choline, liée à la sphingosine par une liaison phosphodiester (Figure I-3 c). Cette classe de lipides est très importante chez les vertébrés et absente chez les bactéries.

Les glycolipides regroupent tous les lipides dont la tête polaire est un sucre (Figure I-3d). On retrouve les galactolipides qui dérivent des glycérolipides (squelette glycérol) et les cérébrosides qui dérivent des sphingolipides (squelette sphingosine).

La répartition des lipides peut être très différente d'une membrane à une autre au sein d'une même cellule (Tableau I-1), ainsi qu'au sein même de celle-ci du fait d'une distribution asymétrique des lipides entre les feuillet externes et internes de la bicouche (Schechter, 1990).

b) Les protéines membranaires

La proportion des protéines par rapport aux lipides est très variable selon le type de membranes. D'une manière générale, plus le ratio protéines/lipides est élevé, plus la membrane considérée aura une activité biologique importante. 30% des protéines exprimées par les eucaryotes sont des protéines membranaires, soulignant ainsi leur importance. Les protéines membranaires sont généralement classées en deux catégories: les protéines extrinsèques et les protéines intrinsèques. Les protéines extrinsèques (ou périphériques) sont associées à la membrane par des interactions électrostatiques avec les parties polaires des lipides ou avec la partie polaire d'autres protéines ancrées dans la membrane. Elles sont donc en contact avec le milieu aqueux (elles sont à caractère hydrosoluble). Les protéines intrinsèques (ou intégrales ou encore transmembranaires) sont associées à la membrane par des interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Ces protéines peuvent être totalement intégrées dans la membrane ou seulement partiellement.

La grande diversité des protéines membranaires, au même titre que celle observée pour les lipides, rend très difficile la description de la composition d'une membrane typique. En effet, le type de cellule ainsi que l'emplacement de la membrane ont une grande influence, non seulement sur les protéines et les lipides présents, mais aussi sur leurs proportions. A ceci s'ajoute une certaine asymétrie entre les deux feuillets lipidiques de la membrane, qui résulte des différences de compositions lipidiques et protéiques entre le feuillet externe et le feuillet interne.

I.1.2 Rôle des membranes

La fonction première d'une membrane est de former une barrière entre deux milieux différents. Les lipides participent en grande partie à cette structuration de l'édifice membranaire, assimilable à une enveloppe protectrice. Cependant, la seule présence d'une membrane n'est pas suffisante pour assurer la survie de la cellule. La cellule (ou organite) doit pouvoir échanger de la matière, de l'énergie et des informations avec le milieu extérieur.

Il existe plusieurs mécanismes de transport des molécules à travers la membrane. Le premier est la diffusion passive des petites molécules à travers la membrane : dans ce cas, la molécule traverse la membrane sans interaction avec les constituants membranaires. Le deuxième mécanisme est la diffusion facilitée. Ce sont des protéines-transporteurs qui assurent le passage des molécules à travers la bicouche, comme les aquaporines pour l'eau par exemple. Dans certains cas, un apport d'énergie est nécessaire afin de permettre le passage de la molécule : on parle alors de transport actif. L'énergie nécessaire au transport actif provient de l'hydrolyse d'une molécule d'Adénosine TriPhosphate (ATP). Les membranes permettent également le passage d'informations biologiques. Celui-ci se fait par l'intermédiaire de messagers extracellulaires (hormones, sucres ou neurotransmetteurs). Ces messagers sont fixés par des récepteurs membranaires de manière spécifique. La reconnaissance du messager par le récepteur induit alors une série de cascades enzymatiques, aboutissant à une réponse cellulaire. Les membranes biologiques possèdent leurs propres collections de récepteurs et de transporteurs, ce qui confère ainsi aux membranes leurs spécificités biologiques.

Les membranes naturelles représentent ainsi un milieu très complexe et diversifié. Afin de les étudier, une modélisation de ces membranes est souvent nécessaire, permettant alors de réduire la complexité du système de départ et de pouvoir cibler certains composés en particulier.

I.1.3 Les membranes modèles

Les modèles membranaires sont généralement constitués d'un nombre restreint de lipides (le plus souvent un ou deux), auxquels des composants membranaires (protéines, peptides...) ou autres composants (toxines, antibiotiques...) sont ajoutés si nécessaire. Ces modèles ont pour objectifs d'être à la fois suffisamment simples pour pouvoir être étudiés à l'aide des différentes techniques physicochimiques et suffisamment représentatifs pour expliquer au mieux les mécanismes membranaires naturels. Afin de bien comprendre ces

modèles de membranes, il est préférable de faire un bref rappel sur le comportement des lipides en solution.

a) Les dispersions aqueuses de lipides

Au cours de ces cinquante dernières années, de nombreuses études sur le comportement des lipides dans l'eau ont été entreprises. Luzzati et al. ont réalisé les premières études structurales sur la diversité des phases formées par les molécules amphiphiles (Luzzati et al., 1968). Les lipides sont des molécules amphiphiles qui ont la faculté de s'auto-assembler dans l'eau (McIntosh and Magid, 1993). Au-delà de la concentration micellaire critique (CMC ; par exemple 10^{-12} M pour le dimyristoyl-phosphatidylcholine, DMPC), les lipides vont spontanément s'associer pour former des agrégats lipidiques. La formation de ces différents agrégats est dirigée par la minimisation des contacts entre la partie hydrophobe des lipides et l'eau (McIntosh and Magid, 1993). La forme de ces assemblages est liée aux tailles relatives des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides (Cullis et al., 1979). Israelachvili a ainsi défini le paramètre de compactage critique, p , qui détermine la forme des objets (Israelachvili et al., 1980) :

$$p = \frac{v}{a_0} * l_c$$

où v est le volume de la partie hydrophobe, a_0 la surface optimale de l'interface entre l'eau et la partie hydrophobe et l_c définit la longueur maximale effective des chaînes hydrophobes. En fonction de la valeur de p , différents agrégats seront obtenus (Figure I-4). Il est important de préciser que le paramètre de compactage critique est plus complexe qu'il n'y paraît, et tient compte également de facteurs tels que la charge de la tête polaire ainsi que des liaisons hydrogène éventuellement présentes (McIntosh and Magid, 1993).

❖ Pour $p < 1/3$, la tête hydrophile est plus importante que la partie hydrophobe. Le lipide a donc une forme conique (inversée) dont le sommet se trouve au niveau de la partie hydrophobe (Figure I-4a). Afin de minimiser les contacts hydrophobes avec l'eau, cette forme de lipides conduit à la formation de micelles sphériques ou de micelles cylindriques. Cette phase concerne en général les lipides à chaînes courtes, les lysophospholipides (ne contenant qu'une seule chaîne aliphatique) et les tensioactifs purs. Cette phase micellaire n'est retrouvée que très rarement dans les milieux biologiques (Cullis et al., 1996).

❖ Pour p compris entre $1/3$ et $1/2$, le lipide est cette fois-ci schématisé comme un cône inversé tronqué (Figure I-4b). Ceci induit la formation d'une phase hexagonale constituée par l'assemblage de micelles cylindriques.

❖ Pour p compris entre $1/2$ et 1 , le cône représentant le lipide est beaucoup moins évasé (quasi cylindrique) (Figure I-4c), ce qui conduit à la formation de phases lamellaires. Dans ce cas, les lipides forment spontanément des vésicules multilamellaires (« Multilamellar Large Vesicles » - MLV). La plupart des lipides des membranes naturelles forment ce genre de phase : c'est le cas notamment de la PC, de la PS ou encore du PI.

❖ Pour p environ égal à 1 , le lipide représente alors un cylindre (Figure I-4d). Ils forment alors un empilement de bicouches lipidiques espacées par des couches aqueuses (rayon de courbure de la membrane infini).

❖ Pour $p > 1$, la partie hydrophobe devient plus importante que la partie hydrophile. Le lipide peut donc être schématisé par un cône (sommet du cône au niveau de la partie hydrophile). Dans ce cas-là, les lipides forment des micelles inversées ou encore une phase hexagonale inversée. La PE peut adopter ce genre de phase.

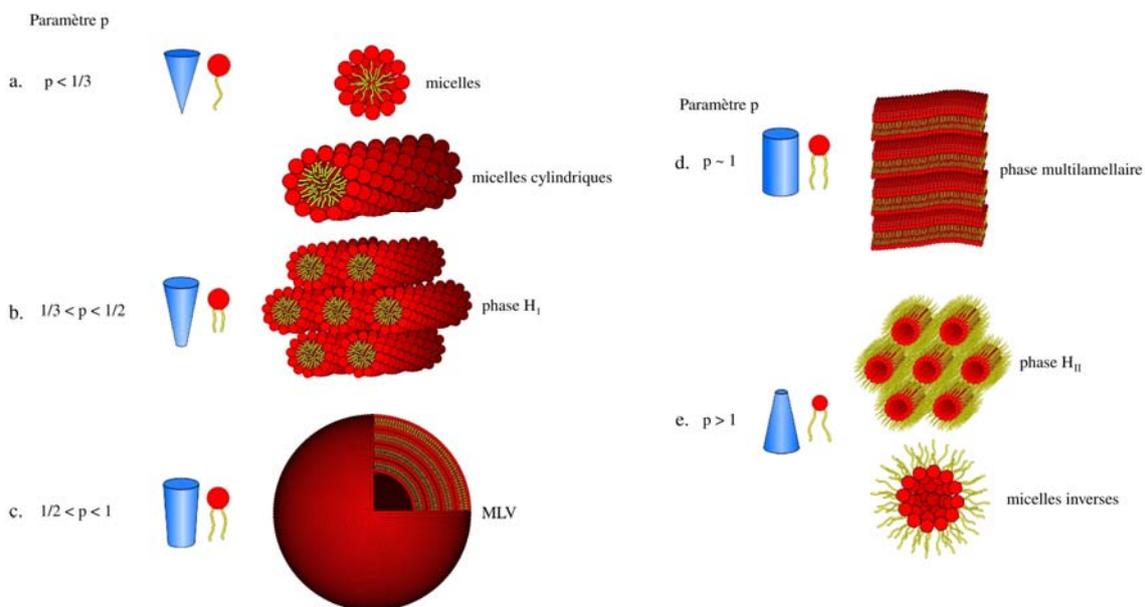


Figure I-4 Organisation des lipides en fonction du paramètre de compactage p (Buchoux, 2008)

Dans le cas de mélanges de lipides plus ou moins miscibles entre eux, un mélange de ces différentes phases peut être observé (Israelachvili et al., 1980). De plus, bien que la « forme » du lipide soit un paramètre déterminant, la concentration en lipides présente également une influence importante sur la phase observée.

b) Les transitions de phase

Il existe plusieurs types de transitions de phase : des transitions de type solide-solide où le système lipidique transite entre deux phases de type solide, des transitions de type fluide-fluide dans lesquelles les deux phases sont fluides et enfin des transitions gel-fluide

pour lesquels le système passe d'une phase de type solide à une phase de type liquide (Seddon et Cevc, 1993). Par la suite, nous ne nous intéresserons qu'à cette dernière transition qui est aussi appelée « chain melting transition » car elle correspond au passage des chaînes d'un état où elles sont figées à un état où elles sont fluides.

Les chaînes aliphatiques des lipides ne se structurent pas de la même manière à basse température qu'à haute température. Lorsqu'on augmente la température d'un système lipidique en phase lamellaire, on observe le passage d'une phase ordonnée ou phase « gel », notée L_{β} ou $L_{\beta'}$ (le prime « ' » signifie que les chaînes lipidiques sont inclinées par rapport à la normale de la bicouche), caractérisée par une conformation tout *trans* des lipides, à une phase « fluide », notée L_{α} , plus désordonnée comprenant des défauts « gauches » (Figure I-5). Dans le cas de la phase « gel », les chaînes sont alignées entre elles et étendues au maximum (Figure I-5a). Cela se traduit alors par une faible mobilité des lipides, ce qui confère un comportement statique à la membrane. En phase « fluide », les chaînes lipidiques deviennent plus mobiles et sont moins étendues (Figure I-5b). Les lipides acquièrent alors une mobilité accrue au sein de la membrane.

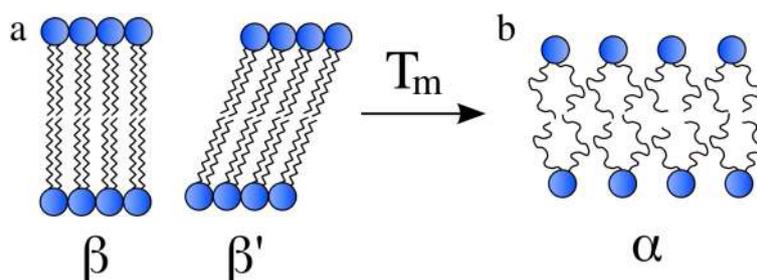


Figure I-5 Différentes conformations des chaînes carbonées dans une bicouche

La température de transition entre phase « gel » et phase « fluide » est généralement notée T_m et dépend de nombreux facteurs tels que, la longueur des chaînes aliphatiques, leur degré d'insaturation, le type de tête polaire (Tableau I-2), mais aussi de la solution dans laquelle les lipides sont dispersés. Par exemple, plus les chaînes d'acides gras sont longues, plus la température de transition de phase augmente. Plus le degré d'insaturation est élevé, plus T_m diminue. En effet, la présence de doubles liaisons crée des défauts de compactage de chaînes, déstabilisant ainsi la phase « gel ».

Certains composés présentent également une influence sur la transition de phase gel-fluide. C'est le cas, par exemple, du cholestérol. En effet, pour des concentrations supérieures à 20% molaire, le cholestérol abolit la transition entre les phases $L_{\beta}/L_{\beta'}$ et L_{α} . Ceci est expliqué par une augmentation de l'ordre des lipides induite par le cholestérol lorsque les lipides se trouvent en phase « fluide » et par une diminution de compactage lorsque les lipides

sont en phase « gel ». On se trouve alors en présence d'une phase « liquide ordonné » (lo) qui semble jouer un rôle dans la formation des radeaux lipidiques. Dans cette phase, les lipides continuent à diffuser latéralement au plan de la membrane, mais les chaînes lipidiques sont fortement ordonnées (Vist et Davis, 1990 ; Aussenac et al., 2003 ; Beck et al., 2007).

Lipides		T _m (°C)
12 :0/12 :0	PC	-1
14 :0/14 :0	PC	23
16 :0/16 :0	PC	41
16 :0/18 :1cΔ ⁹	PC	-36
18 :0/18 :0	PC	54
18 :1cΔ ⁹ /18 :1cΔ ⁹	PC	-20
16 :0/16 :0	PE	63
16 :0/16 :0	PS	55
16 :0/16 :0	PA	67

Tableau I-2 Variations de la température de transition de phase gel/fluide en fonction de la longueur de chaînes, du nombre d'insaturations et de la tête polaire du lipide. La première colonne indique le nombre de carbones sur chaque chaîne ainsi que le nombre de doubles liaisons. Δ indique la position de la double liaison et c signifie cis. PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PS, phosphatidylsérine ; PG, phosphatidylglycérol ; PA, acide phosphatitique (Cullis, 1996).

L'analyse des propriétés thermotropes et lyotropes des dispersions lipidiques en phase aqueuse a permis l'établissement de diagrammes de phase température-hydratation spécifiques à un lipide ou à un mélange de lipides. Koynova et Caffrey ont d'ailleurs publié un index regroupant la plupart des diagrammes de phase (Koynova et Caffrey, 2002).

c) Quelques exemples de modèles membranaires couramment utilisés

Comme nous l'avons précédemment mentionné, différents types de modèles de membranes ont été développés afin de mimer au mieux le milieu membranaire tout en restant un système relativement simple à étudier.

Les micelles et les micelles mixtes sont des modèles que l'on retrouve souvent dans l'étude des protéines membranaires. Cependant, ces objets isotropes ne sont pas constitués de bicouches lipidiques et ne sont donc pas vraiment représentatifs des membranes biologiques (Sanders et Oxenoid, 2000 ; Fernández et al., 2001 ; Lau et al., 2008).

Les vésicules multilamellaires (MLVs) ou unilamellaires (SUVs, LUVs ou GUVs) sont les modèles les plus couramment utilisés de part leur facilité de préparation. De plus, ces objets sont préparés à base de phospholipides formant une ou plusieurs bicouches, structure à

la base des membranes biologiques (Sanders et Oxenoid, 2000 ; Léonard et al., 2001 ; Villar et al., 2001 ; Aussenac et al., 2003). Par conséquent, ces vésicules constituent un bon modèle pour les membranes biologiques. A partir de ces MLV, il est possible de former par extrusion ou par sonication, des vésicules unilamellaires (plus proches des membranes naturelles) de tailles variables allant de quelques dizaines de nm pour des SUVs (« Small Unilamellar Vesicles ») à quelques microns pour GUVs (« Giant Unilamellar Vesicles »), en passant par les LUVs (« Large Unilamellar Vesicles ») qui ont un diamètre de quelques centaines de nm.

Nous pouvons également citer les bicelles qui sont des objets discoïdaux constitués d'une bicouche de phospholipides planes et qui ont la faculté de s'orienter spontanément dans un champ magnétique (Sanders et Oxenoid, 2000 ; Lau et al., 2008 ; Park et al., 2008 ; Diller et al., 2009). Ces systèmes s'avèrent très intéressants dans l'étude structurale des protéines membranaires.

Récemment, des préparations à base d'extraits naturels de membranes ont été développées afin de se rapprocher le plus possible du contexte physiologique. Cependant, ces modèles sont aussi les plus complexes à analyser (Etzkorn et al., 2007).

Parmi ces modèles membranaires, nous avons utilisés dans le cadre de ce travail des liposomes multilamellaires (MLVs), reconstitués en utilisant une composition en lipides le plus proche possible de celle des membranes naturelles que nous souhaitons étudier.

I.2 L'enveloppe nucléaire

La plupart des cellules possèdent un noyau renfermant toute l'information génétique. Ce noyau est entouré par une enveloppe nucléaire, permettant ainsi une séparation physique entre le nucléoplasme et le cytoplasme de la cellule (Burke et Ellenberg, 2002 ; Prunuske et Ullman, 2006 ; Crisp and Burke, 2008 ; Webster et al., 2009).

I.2.1 Structure et dynamique de l'enveloppe nucléaire

L'enveloppe nucléaire est constituée de deux bicouches lipidiques (Figure I-6) : la membrane interne et la membrane externe (Prunuske et Ullman, 2006 ; Crisp et Burke, 2008 ; Webster et al., 2009). La membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique (RE) et présente des marqueurs protéiques similaires à celui-ci. La membrane interne possède une composition protéique particulière et spécifique. On retrouve en particulier des récepteurs à Lames B (LBR), des protéines de la famille des polypeptides associés à la lamina (LAP1 et LAP2) et des émérines (Burke et Ellenberg, 2002 ; Prunuske et Ullman, 2006).

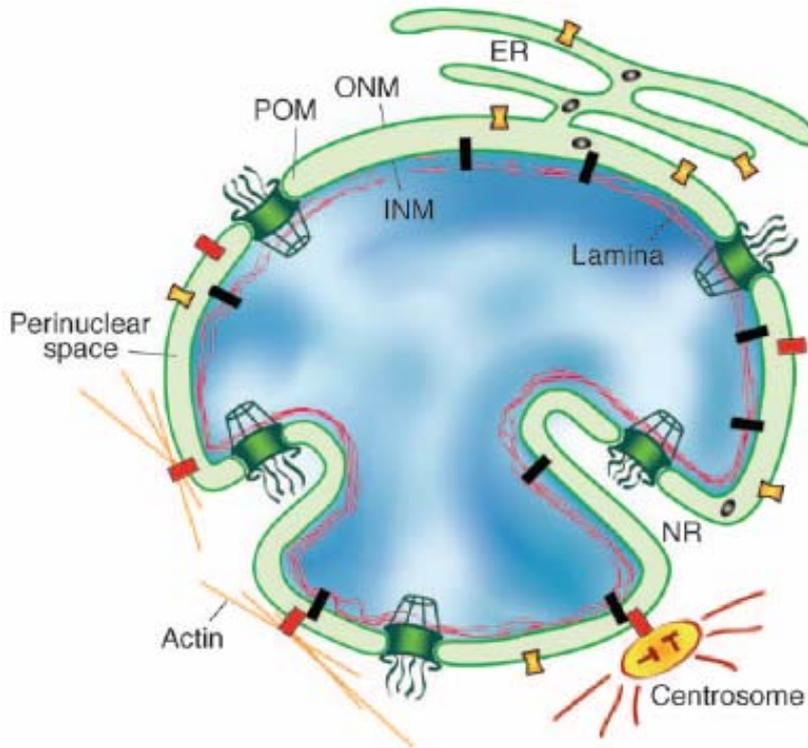


Figure I-6 Structure du noyau d'une cellule eucaryote (Prunuske, 2006). En vert est représenté les membranes et en bleu nous avons la chromatine. INM : Inner Nuclear Membrane, Membrane nucléaire interne ; ONM : Outer Nuclear Membrane, membrane nucléaire Interne; ER: Endoplasmic Reticulum, Réticulum Endoplasmique; Perinuclearspace : espace périnucléaire.

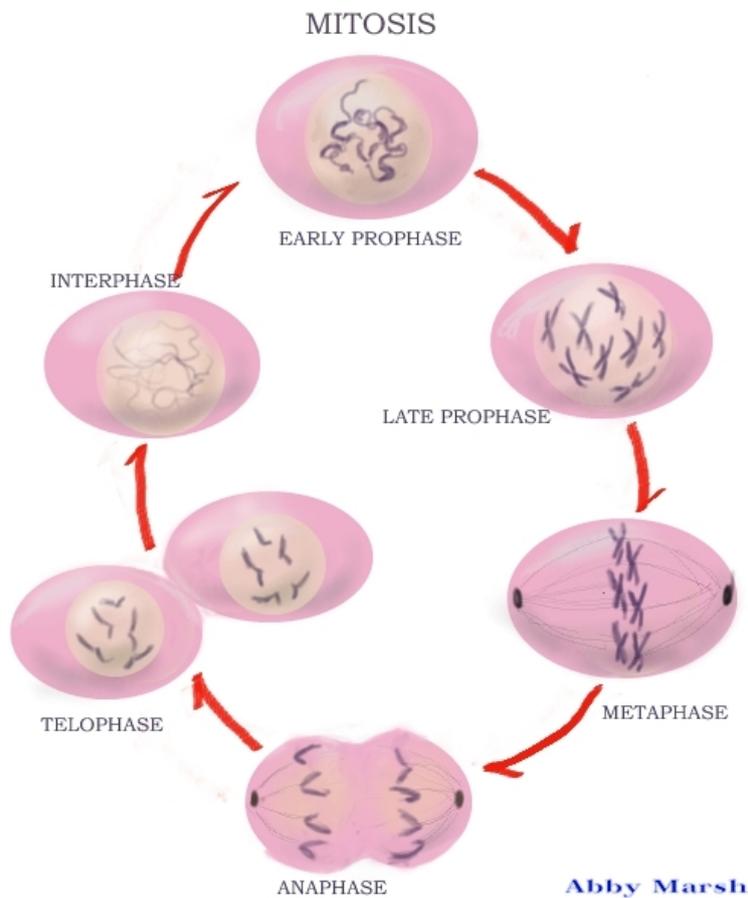


Figure I-7 Les différentes étapes de la division cellulaire

Afin de permettre des échanges entre le noyau et le cytoplasme, l'enveloppe nucléaire est pourvue de pores formés à l'aide de complexes protéiques de nucléoporines (Burke and Ellenberg, 2002 ; Prunuske et Ullman, 2006). Ces pores permettent le passage de petites molécules mais aussi de macromolécules telles que l'acide ribonucléique messager (ARNm).

Sous la membrane interne se trouve la lamina, un réseau de filaments constitués de lamines de type A/C et de type B (Buendia et al., 2001 ; Burke et Ellenberg, 2002 ; Crisp et Burke, 2008 ; Webster et al., 2009). La lamina et la chromatine sont liées à la membrane interne à l'aide des protéines intégrales de la membrane interne (Buendia et al., 2001 ; Burke and Ellenberg, 2002 ; Crisp et Burke, 2008). Les interactions moléculaires entre ces trois composants du noyau sont cruciales au maintien de la structure et de l'organisation de l'enveloppe nucléaire (Buendia et al., 2001 ; Webster et al., 2009).

Au cours de la mitose, l'enveloppe nucléaire subit d'importants changements structuraux (Figure I-7) (Buendia et al., 2001 ; Burke et Ellenberg, 2002 ; Prunuske et Ullman, 2006 ; Crisp et Burke, 2008 ; Webster et al., 2009). En effet, lors de la transition prophase-prométaphase, l'enveloppe nucléaire se rompt puis se reforme lors de la télophase autour du noyau des deux cellules filles issues de la division cellulaire. On parle alors de mitose « ouverte ». Dans le cas des levures, la rupture de l'enveloppe nucléaire n'est pas nécessaire à la division cellulaire et donc elle reste intacte tout le long de la mitose : on parle alors de mitose « fermée ». Dans le cadre de notre étude, nous ne considérerons que le cas de la mitose « ouverte ».

La rupture de l'enveloppe nucléaire est généralement accompagnée de la dépolymérisation de la lamina et de la solubilisation des pores nucléaires dans le cytoplasme (Buendia et al., 2001 ; Burke et Ellenberg, 2002 ; Crisp et Burke, 2008). Les mécanismes de rupture de l'enveloppe nucléaire sont assez mal connus à ce jour. Deux mécanismes sont cependant proposés : une vésicularisation sélective de l'enveloppe nucléaire qui tiendrait compte des différents compartiments membranaires (membrane interne et membrane externe) ou la dispersion des composants de l'enveloppe nucléaire dans le réticulum endoplasmique (Burke et Ellenberg, 2002 ; Prunuske et Ullman, 2006 ; Anderson et Hetzer, 2008 ; Webster et al., 2009). A la fin de la mitose, l'enveloppe nucléaire se reforme autour de chaque noyau des deux cellules filles. Comme pour le cas de la rupture de l'enveloppe nucléaire, deux mécanismes sont proposés. Le premier modèle considère que la formation de l'enveloppe nucléaire se ferait par un enveloppement du noyau par des extensions du réticulum endoplasmique (RE), sans impliquer des processus de fusion (Burke and Ellenberg, 2002 ; Anderson et Hetzer, 2008 ; Webster et al., 2009). Les trous existants entre les extensions du

RE seraient alors comblés par les pores nucléaires. Le deuxième modèle implique des processus de fusion membranaire soit entre les vésicules éventuellement formées lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, soit au niveau des trous entre les extensions du RE, mentionnés précédemment, afin de les combler (Prunuske et Ullman, 2006 ; Baur et al., 2007 ; Larijani et Poccia, 2009).

Afin d'obtenir une enveloppe nucléaire fonctionnelle, les pores nucléaires doivent être reconstitués afin de permettre le passage des lamines dans le noyau nécessaire à la reformation de la lamina (Burke et Ellenberg, 2002 ; Webster et al., 2009). Lors d'une dernière étape, le noyau va gonfler afin de permettre la décondensation de la chromatine (Prunuske et Ullman, 2006 ; Anderson et Hetzer, 2008 ; Webster et al., 2009).

I.2.2 Les envelopathies nucléaires

Lors de ces dix dernières années, il a été mis en avant que des dérèglements au niveau de la formation de l'enveloppe nucléaire peuvent entraîner un certain nombre de maladies. A ce jour, 24 pathologies sont associées à des mutations au niveau des gènes encodant les lamines ou des protéines associées à l'enveloppe nucléaire. On parle d'envelopathies nucléaires (Somech et al., 2005 ; Worman et Bonne, 2007 ; Crisp and Burke, 2008 ; Cohen et al., 2008).

Les laminopathies résultent de mutations au niveau du gène LMNA encodant les lamines de type A/C (Somech et al., 2005 ; Worman et Bonne, 2007 ; Crisp and Burke, 2008 ; Cohen et Stewart, 2008). Parmi elles, on peut citer à titre d'exemple la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, la cardiomyopathie dilatée, ou encore le syndrome de Hutchinson-Gilford (syndrome de vieillissement prématuré) (Worman et Bonne, 2007 ; Cohen et al., 2008). Des mutations au niveau du gène encodant les lamines de type A engendreraient une absence ou un manque de lamines A fonctionnelles (Worman et Bonne, 2007). Ceci induirait une faiblesse ou une dépolymérisation de la lamina, ainsi que des interactions manquantes entre la lamina, la chromatine et l'enveloppe nucléaire, ayant pour conséquence la formation d'une enveloppe nucléaire anormale (Worman et Bonne, 2007 ; Webster et al., 2009), autant au niveau de sa morphologie que dans l'organisation de la chromatine (Figure I-8). Des maladies en relation avec d'autres protéines de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, telles que les LBR, les LAP2, ou encore les émérines ont récemment été découvertes (Somech et al., 2005 ; Cohen et al., 2008 ; Crisp et Burke, 2008).

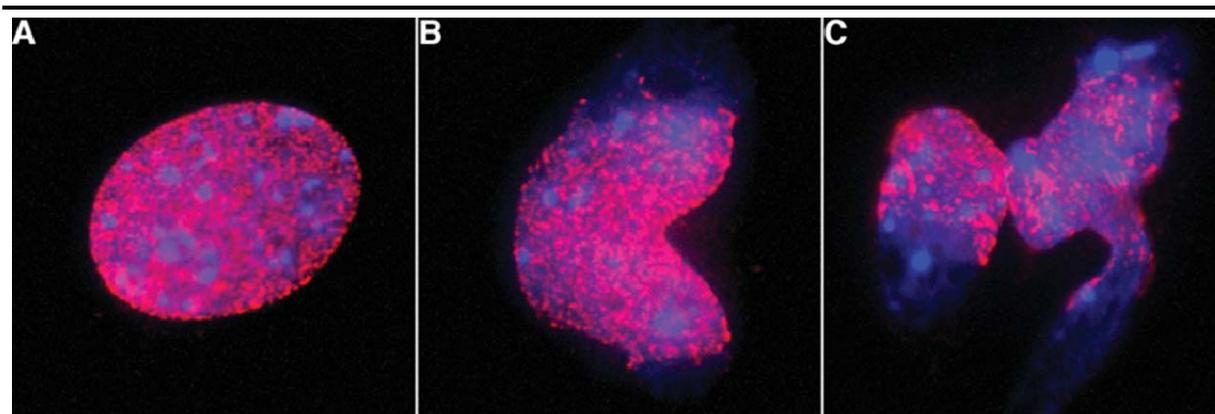


Figure I-8 Exemples de noyaux cellulaires dans des laminopathies (adapté de Cohen et al., 2008). A représente une image d'un noyau normal. B : Noyau n'exprimant ni les lamines A ni les lamines C. Le noyau change considérablement de structure. C : Noyau issu d'une cellule de souris atteinte de cardiomyopathie. A-C : L'ADN est en bleu et les pores nucléaires sont en rouge.

Des malformations de l'enveloppe nucléaire ont également été constatées dans de nombreux cancers. Les cellules cancéreuses présentent très souvent des changements structuraux (Zink et al., 2004). Ces changements concerneraient également l'enveloppe nucléaire (Fischer et al., 2003 ; Fischer et al., 2004 ; Zink et al., 2004; Webster et al, 2009). Des modifications au niveau de la forme du noyau, ainsi qu'au niveau de l'organisation de la chromatine constituent un phénotype bien défini dans des cellules cancéreuses (Fischer et al., 2003 ; Fischer et al., 2004 ; Zink et al., 2004). Ces perturbations pourraient induire le dérèglement observé des cellules cancéreuses (Zink et al., 2004). En effet, une enveloppe nucléaire défectueuse engendrerait des perturbations au niveau de l'organisation de la chromatine et de la position des gènes, ce qui pourrait entraîner une altération de l'expression génique, contribuant ainsi aux processus de transformations malins (Zink et al., 2004).

La formation de l'enveloppe nucléaire constitue un événement essentiel du cycle cellulaire qui détermine un fonctionnement normal de la cellule. A ce jour, les relations de causes à effets entre pathologies et enveloppe nucléaire défaillante ne sont pas encore bien élucidées (Fischer et al., 2004 ; Zink et al., 2004). L'étude des mécanismes moléculaires impliqués lors de la formation de l'enveloppe nucléaire apparaît donc essentielle. Par conséquent, des modèles d'étude de l'enveloppe nucléaire ont été développés afin d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

I.3 Formation du pronoyau comme modèle d'étude pour la formation de l'enveloppe nucléaire

La formation de l'enveloppe nucléaire se produit lors de chaque mitose. Un processus similaire est observé lors de la fécondation. Après son entrée dans l'ovocyte, le spermatozoïde perd son enveloppe nucléaire, qui est dépourvue de pores et donc inactive au niveau de la réplication de l'ADN et de la transcription, dans le but d'en reformer une active. On parle alors de la formation du pronoyau mâle. La formation du pronoyau implique plusieurs étapes, telles que la vésicularisation de l'enveloppe nucléaire, la décondensation de la chromatine, l'arrimage de vésicules du cytoplasme de l'ovocyte sur la chromatine, la fusion de ces vésicules et enfin le gonflement du noyau qui sera accompagné de l'importation des lamines afin de reformer la lamina (nécessite que les pores nucléaires soient formés). Ce pronoyau va ensuite fusionner avec le pronoyau femelle pour donner le zygote (Figure I-9).

Il a été mis en évidence que les mécanismes moléculaires impliqués lors la formation de l'enveloppe nucléaire semblaient similaires, aussi bien dans les modèles issus de cellules somatiques que dans ceux issus d'ovocytes (Gant et Wilson, 1997). De ce fait, la formation de l'enveloppe nucléaire du pronoyau peut être utilisée comme modèle d'étude de la formation de l'enveloppe nucléaire dans les cellules somatiques.

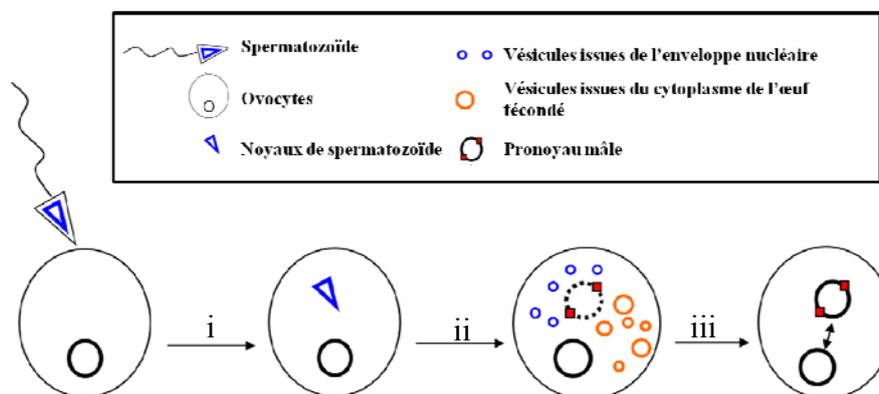


Figure I-9 Schéma explicatif du processus de fécondation (Longo et Anderson, 1968). (i) Le spermatozoïde rentre dans l'œuf. La formation du pronoyau implique plusieurs étapes telles que la vésicularisation de l'enveloppe nucléaire, la décondensation de la chromatine (ii), l'arrimage de vésicules du cytoplasme de l'œuf sur la chromatine, la fusion de ces vésicules afin de reformer une enveloppe nucléaire (iii). Ce pronoyau va ensuite fusionner avec le pronoyau femelle pour donner le zygote (iii).

La formation de l'enveloppe nucléaire a été reconstituée pour la première fois *in vitro* à l'aide d'un système dérivant d'extraits d'ovocytes de xénope (variété de grenouilles) (Lohka et Masui, 1983). Ce système s'est révélé facile à manipuler et a permis d'obtenir des informations plus précises sur les étapes clés de la formation de l'enveloppe nucléaire. De nombreux modèles ont par la suite été développés à partir de divers organismes, tels que les drosophiles, les palourdes ou bien les oursins (Burke et Gerace, 1986 ; Cameron et Poccia, 1994 ; Zhao et al., 2000 ; Lu et Zhai, 2001). Les différentes études menées sur ces modèles *in vitro* ont montré que ces derniers sont utiles pour un certain nombre de raisons. Par exemple,

il est facile de purifier une large quantité de gamètes, éléments fondateurs de ces modèles *in vitro*. De plus, ces systèmes sont facilement manipulables avec des inhibiteurs, des protéines recombinées ou bien encore des anticorps, permettant ainsi l'étude au niveau moléculaire des différentes étapes de la formation de l'enveloppe nucléaire. Une démarche pertinente pour étudier les mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire est donc d'exploiter les avantages des systèmes *in vitro* afin d'élucider les points clés, puis de retourner dans les systèmes *in vivo* (à l'aide des techniques de microinjection et d'immunofluorescence), afin de valider les observations faites *in vitro*. Il est ensuite important de vérifier la reproductibilité des résultats dans les cellules mitotiques en utilisant des ovocytes subissant l'embryogénèse (étape de la fécondation où les cellules endurent les processus de mitose) puis enfin sur des cellules somatiques.

Parmi tous ces systèmes modèles, ceux dérivant de gamètes d'oursins semblent présenter le plus d'avantages d'un point de vue pratique, économique et biologique (Larijani et Poccia, 2009). En pratique, l'isolation des spermatozoïdes est beaucoup plus simple chez les oursins que chez les xénopes, par exemple, qui nécessitent différentes opérations comme l'anesthésie des grenouilles, puis des étapes de dissections et d'incubations avant l'isolation des spermatozoïdes (Newmeyer et al., 1991). Chez les oursins, une simple injection de KCl suffit pour isoler les spermatozoïdes et les ovocytes (Cameron et Poccia, 1994). Les ovocytes d'oursins sont translucides, ce qui facilite les opérations de microinjection afin de suivre les transitions *in vivo* et de les corrélérer avec les observations *in vitro* (Cothren et Poccia, 1993 ; Byrne et al., 2007). De plus, chaque étape de la formation de l'enveloppe nucléaire peut être contrôlée *in vitro* et facilement caractérisée par microscopie optique et par microscopie à fluorescence (Collas et Poccia, 2000). D'un point de vue biologique, les oursins présentent également un certain nombre d'avantages. Premièrement, les ovocytes d'oursins sont arrêtés lors de la deuxième méiose en phase G0, tandis que les xénopes sont arrêtés au stade de la métaphase de la deuxième méiose. Par conséquent, chez les oursins, les cycles cellulaires suivant la fécondation sont synchrones et non compliqués par la fin de la méiose. De plus, il a été montré récemment que le génome des oursins présenterait la même diversité que le génome humain, bien que moins complexe (Sodergren et al., 2006). Tous ces points indiquent que les oursins représentent le meilleur modèle d'étude de l'enveloppe nucléaire.

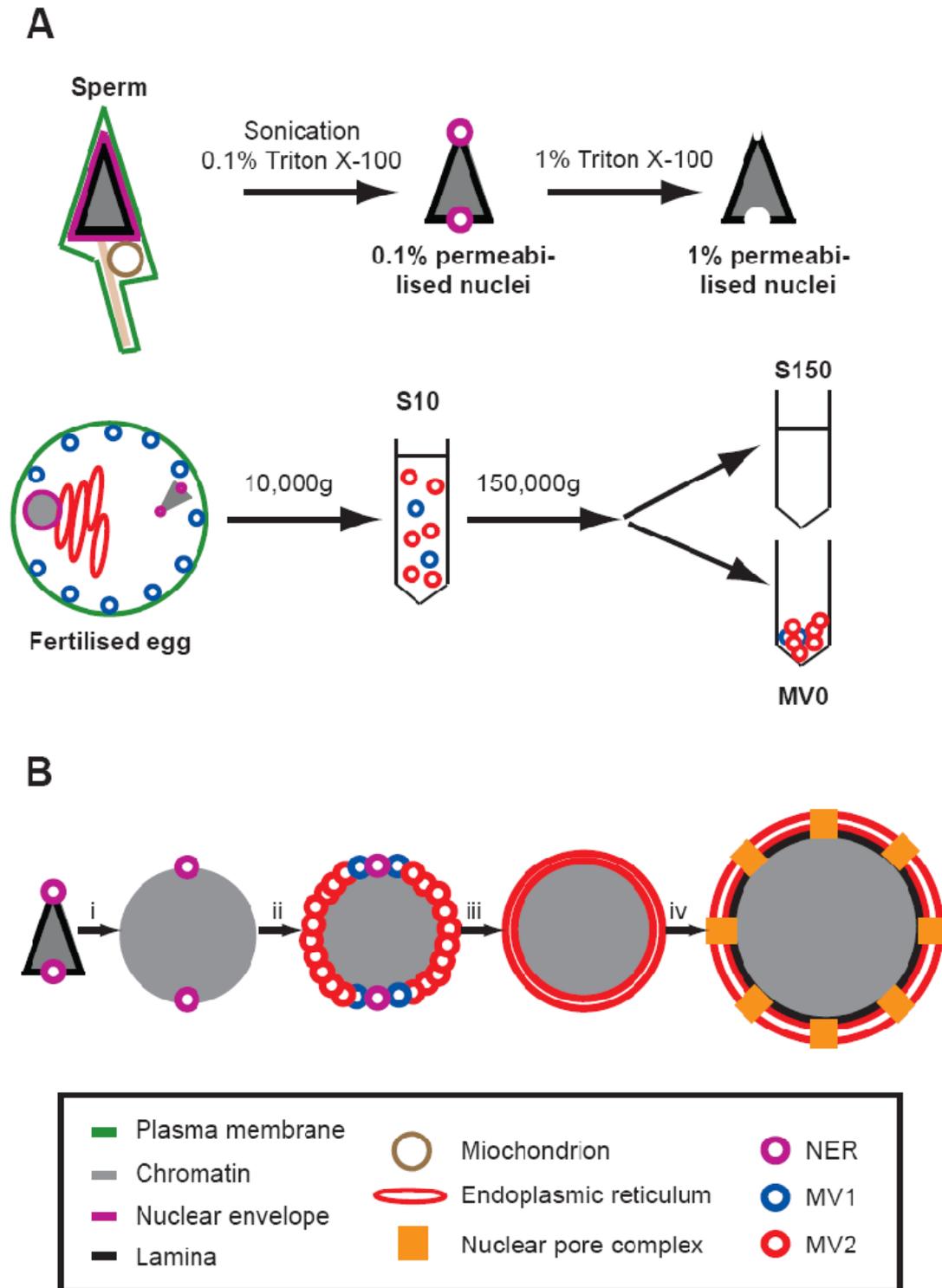


Figure I-10 Composants du système *in vitro* et formation de l'enveloppe nucléaire (extrait de Garnier, 2007). (A) L'enveloppe nucléaire du noyau de spermatozoïde est solubilisée à l'aide de 0,1 % v/v de Triton X-100. Les NERs (« Nuclear Envelope Remnants ») sont retenus à chaque pôle du noyau. Les NERs peuvent être solubilisés avec une concentration plus forte de détergent (1% v/v de Triton X-100). Les œufs fécondés sont lysés puis centrifugés à 10 000g. Le surnageant S10 est constitué du cytosol de l'œuf fécondé et des vésicules membranaires MV0s précurseurs de l'enveloppe nucléaire. Les MV0s sont isolés de S10 par centrifugation à 150 000g. Le surnageant nommé S150 est seulement constitué du cytosol de l'œuf fécondé. (B) Décondensation de la chromatine (i). Arrimage des vésicules autour du noyau. Les MV1 s'arriment au niveau des NERs tandis que les MV2 s'arriment sur toute la surface du noyau (ii). Fusion des vésicules autour du noyau. Les NERs sont incorporés dans l'enveloppe nucléaire ainsi formée (iii). Gonflement du noyau ainsi que formation de la lamina (iv).

I.3.1 Formation *in vitro* de l'enveloppe nucléaire

Le système *in vitro* développé par Cameron et Poccia (Cameron et Poccia, 1994) a facilité de manière considérable l'étude des processus impliqués lors de la formation de l'enveloppe nucléaire. Ce système implique des noyaux de spermatozoïdes perméabilisés ainsi que le cytoplasme des ovocytes fécondés (Figure I-10A).

L'enveloppe nucléaire du noyau de spermatozoïde est solubilisée avec un détergent non-ionique, le Triton X-100 ($C_{33}H_{60}O_{10.5}$). Les noyaux ainsi préparés sont dépourvus de vésicules acrosomales, de mitochondries, de leur flagelle, de leur membrane plasmique et de leur enveloppe nucléaire (Byrne et al., 2009a). Nous désignerons les noyaux ainsi préparés : « noyaux perméabilisés ». Les noyaux de spermatozoïdes perméabilisés retiennent, à chacun de leur pôle, des portions de membranes résistantes à la solubilisation (Figure I-11 : Collas et Poccia, 1995b). Ces membranes sont dénommées les NERs pour « Nuclear Envelope Remnants ». De telles membranes ont déjà été mentionnées *in vivo* chez un certain nombre d'espèces (Rothschild, 1956 ; Longo et Anderson, 1968).

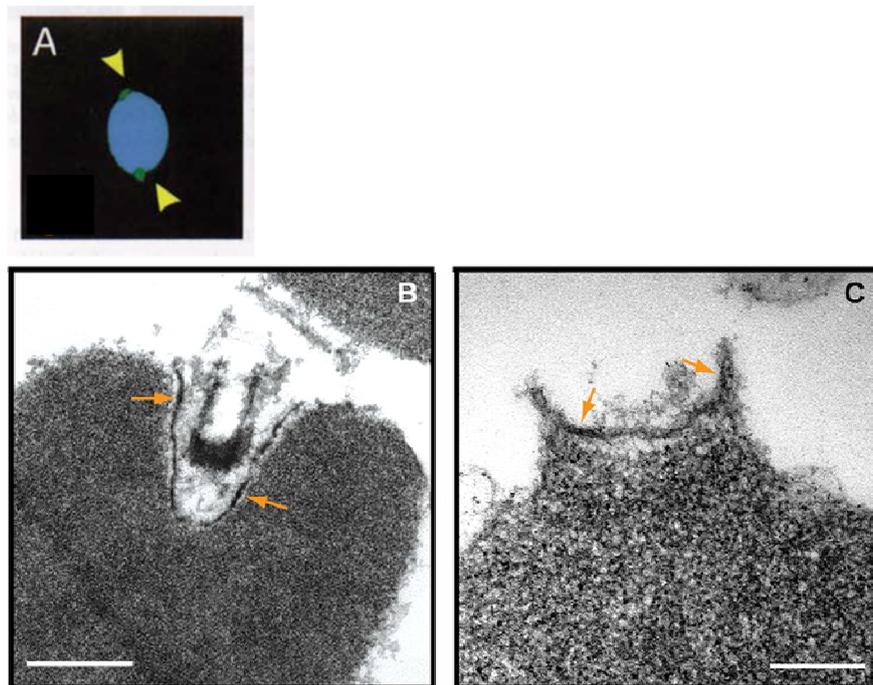


Figure I-11 Clichés des portions rémanentes de l'enveloppe nucléaire (Collas et Poccia, 1995b ; Garnier-Lhomme et al., 2009). (A) Noyau perméabilisé isolé observé par microscopie à fluorescence. La chromatine est marquée avec un fluorophore bleu (Hoechst 33342). Les NERs sont observés en vert et se situent bien à chaque pôle du noyau (fluorophore lipophile DHCC). (B et C) Clichés de microscopie électronique des NERs (pris sur des noyaux préalablement perméabilisés ne retenant donc que les NERs). Confirmation de la présence de membrane (bicouche) au niveau de chaque pôle. Echelle 400 nm pour B et 200 nm pour C.

Le cytoplasme des ovocytes fécondés est obtenu après centrifugation à 10 000g (plus précisément c'est le surnageant issu de cette centrifugation) (Byrne et al., 2009a). Nous désignerons cette fraction S10. S10 sera à son tour centrifugée à 150 000 g afin d'obtenir la séparation des vésicules membranaires et du cytosol de l'ovocyte fécondé (Byrne et al., 2009). La fraction correspondant aux vésicules membranaires sera nommée MV0s et la fraction cytosol sera désignée comme S150.

La formation de l'enveloppe nucléaire *in vitro* est un processus en plusieurs étapes, comprenant la décondensation de la chromatine, l'arrimage autour du noyau de vésicules membranaires provenant du cytoplasme de l'ovocyte fécondé, la fusion de ces vésicules et enfin un gonflement du noyau (Figure I-10B).

a) La décondensation de la chromatine

Après la pénétration du spermatozoïde dans l'œuf et la rupture de son enveloppe nucléaire, la chromatine du spermatozoïde se décondense et le noyau passe d'une forme conique à une forme sphérique. Ce processus est également observé *in vitro* et serait déclenché par l'action de deux kinases (enzymes catalysant les réactions de phosphorylation), PKC (protéine kinase C) et CDK2 (kinase dépendante à la cycline), présentes dans le cytosol de l'œuf fécondé (Stephens et al., 2002). La décondensation de la chromatine *in vitro* se fait à partir du noyau de spermatozoïde solubilisé.

b) L'arrimage des vésicules membranaires provenant du cytoplasme de l'œuf fécondé autour du noyau

Suite à la décondensation de la chromatine, des vésicules provenant du cytoplasme de l'ovocyte fécondé se lient à la périphérie du noyau. Cette étape nécessite l'ajout d'ATP au système mais ne dépend pas de la décondensation de la chromatine ou encore de l'hydrolyse de l'ATP (Cameron et Poccia, 1994 ; Collas et Poccia, 1995b). Il a été observé que l'arrimage de ces vésicules se fait de manière polarisée démarrant au niveau des pôles du noyau puis se propageant sur toute sa surface (Collas et Poccia, 1996). Plusieurs populations de vésicules membranaires provenant du cytoplasme de l'œuf fécondé ont été déterminées mais seulement deux d'entre elles participeraient à la formation de l'enveloppe nucléaire, MV2 (MV2 α et MV2 β) et MV1 (Collas et Poccia, 1996). Ces vésicules présentent des différences importantes au niveau de leur taille, de leur composition mais également au niveau de leurs caractéristiques d'arrimage au noyau (Tableau I-3) (Collas et Poccia, 1996).

Les vésicules MV2 β dériveraient du réticulum endoplasmique car elles sont riches en protéines (récepteurs aux lamines B, LBR et lamines B), que l'on retrouve généralement dans celui-ci. Ces vésicules sont capables de se lier sur toute la surface du noyau (Figure I-12A MV2 β). Leur attache au noyau serait régie par des protéines intégrales de type LBR (Collas et Poccia, 1996 ; Collas et al., 1996). Les vésicules MV2 α proviendraient de l'appareil de Golgi. Les MV2 α se lient exclusivement aux pôles du noyau où se trouvent les NERs (Figure I-12A MV2 α). Cette étape semble être dirigée par des protéines périphériques. Au total, les MV2 représentent 90% des vésicules membranaires participant à la formation de l'enveloppe nucléaire. La composition lipidique des MV2 (Tableau I-3) est équivalente à celle d'une membrane de type classique avec de la PC, de la PE et du cholestérol en composants principaux (Byrne et al., 2007).

Les MV1 se lient exclusivement au niveau des NERs (Figure I-12A MV1: Collas et Poccia, 1996 ; Dumas et al., 2010). Des protéines périphériques seraient impliquées dans ce processus. Une analyse lipidomique a révélé que ces membranes sont tout à fait particulières (Tableau I-3). En effet, ces vésicules sont enrichies à 60% molaire en phosphoinositides insaturés (Byrne et al., 2007), lipides que l'on retrouve le plus souvent en très faible proportion dans les membranes naturelles (Di Paolo et De Camilli, 2006). De plus, une analyse protéomique a également révélé que ces vésicules sont enrichies en PLC γ , phospholipase qui hydrolyse PI-4,5-P₂ en DAG. Il est important de noter que des vésicules similaires à MV1 ont été observées *in vivo*. Des vésicules enrichies en PLC γ ont en effet été visualisées par immunofluorescence dans la région du cortex de l'ovocyte (Byrne et al., 2007).

Les NERs ont un rôle clé dans l'étape d'arrimage des vésicules sur la surface du noyau (Collas et Poccia, 1995b). Les NERs peuvent être entièrement solubilisés par 1 % (v/v) de Triton X-100. Cette manipulation empêche totalement la fixation des vésicules et donc la formation de l'enveloppe nucléaire. Cependant, en restaurant les NERs, l'arrimage des vésicules autour du noyau est de nouveau observé. Ces observations, ainsi que le fait que les NERs soient également conservés *in vivo* confirment l'existence biologique de ces portions de membranes. Ces NERs possèderaient également un rôle dans le maintien de l'organisation de la chromatine au niveau des pôles du noyau (Garnier, 2007).

L'analyse de la composition lipidique a révélé que ces membranes sont fortement enrichies en phosphoinositides insaturés (60 % molaire des phospholipides) et en cholestérol (42% molaire des lipides) (Tableau I-3) (Garnier-Lhomme et al., 2009).

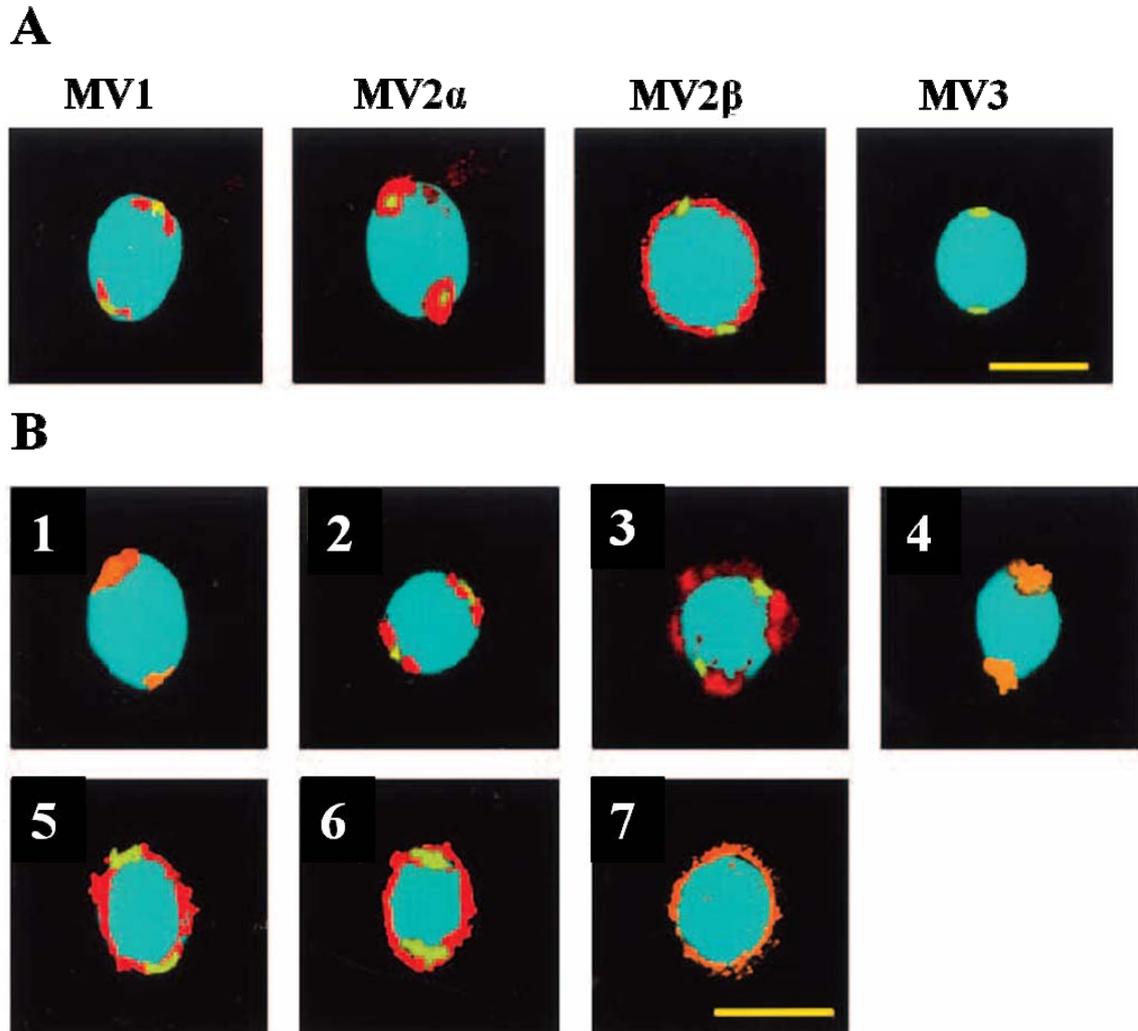


Figure I-12 (A) Caractéristiques d'arrimage des vésicules membranaires MV1, MV2 α , MV2 β et MV3 (Collas et Poccia, 1996). MV1 et MV2 α se fixent au niveau des NERs, MV2 β sur toute la surface du noyau. MV3 (vésicules provenant également du cytoplasme de l'œuf fécondé) n'arriment pas au noyau et ne participent donc pas à la formation de l'enveloppe nucléaire. Le noyau est marqué avec un fluorophore bleu (Hoescht) et les membranes avec des fluorophores lipophiles (pour plus de détails voir Collas et Poccia, 1996). La barre d'échelle est de 5 μ m. **(B) Caractéristiques de fusion des vésicules entre elles et avec les NERs (Collas et Poccia, 1996).** (1) MV1 fusionnent avec les NERs. (2) MV2 α ne fusionnent pas avec les NERs. (3) MV2 β ne fusionnent pas avec les NERs. (4) MV2 α fusionnent avec les MV1. (5) MV2 β ne fusionnent pas avec les MV1 en l'absence des MV2 α . (6) MV1 fusionnent avec les MV2 α et les MV2 β . Ceci montre le pouvoir fusogène des MV1. La fusion est déterminée par l'observation de fluorescence orange (pour plus d'explication se référer à Collas et Poccia, 1996).

Membranes	Origine	Marqueurs protéiques	Composition lipidique	Site de fixation	Rôle dans l'initiation de la fusion
NERs	Spermatozoïde	nd	PC : 18±2 Chol : 42±10 PI : 10 ±2 PIP : 7±2 PIP ₂ : 7±1 PIP ₃ : 5±1 PE : 7±1 PA : 0,6±0,1 PS : 2,0±0,4 PG : 1,5±0,1	Pôles du noyau	Indispensable
MV1	Cytoplasme de l'œuf fécondé	PLCγ Src Kinase	PC : 32±4 Chol : 10±10 PI : 20±3 PIP : 18±5 PIP ₂ : 12±6 PIP ₃ : 8±3 PE : 2±1 PA : 2,0±0,5 PS : 2,0±0,3	NERs	Indispensable
MV2	Cytoplasme de l'œuf fécondé	<u>MV2α</u> : Golgi <u>MV2β</u> : RE	PC : 26±3 Chol : 20±10 PI : 16±2 PIP : 0,7±0,2 PIP ₂ : 0,4±0,3 PIP ₃ : 1,2±0,6 PE : 20±3 PA : 0,0±0,0 PS : 4±1	<u>MV2α</u> : NERs <u>MV2β</u> : surface du noyau	<u>MV2α</u> : non <u>MV2β</u> : non

Tableau I-3 Caractéristiques des membranes participant à la formation de l'enveloppe nucléaire (Collas et Poccia, 1996 ; Byrne et al., 2007 ; Garnier-Lhomme et al., 2009 ; Byrne et al., 2009c). RE : réticulum endoplasmique ; nd : non déterminé.

A notre connaissance, aucune autre membrane présentant une composition lipidique similaire n'a été mentionnée dans la littérature. Une étude de la dynamique membranaire des NERs a révélé que ces membranes se trouvent en phase liquide ordonnée (Garnier-Lhomme et al., 2009). Cette phase engendre une grande stabilité et une résistance au détergent (Ge et al., 1999 ; Brown et London, 2000 ; London et Brown, 2000). De ce fait, il a été avancé que la composition lipidique des NERs engendrerait une phase liquide ordonnée, qui conférerait alors aux NERs leur grande stabilité (des interactions entre les protéines des NERs et la chromatine rentrent également en compte) (Garnier-Lhomme et al., 2009).

c) La fusion des vésicules et des NERs afin de former une enveloppe nucléaire

Suite à l'étape de fixation des vésicules autour du noyau, celles-ci doivent fusionner entre elles et avec les NERs afin de former une enveloppe nucléaire complète. Dans le système *in vitro*, cette étape nécessite l'ajout de GTP et semble être dépendante de l'activité d'une GTPase (Collas et Poccia, 1996 ; Byrne et al., 2005 ; Dumas et al., 2010). Le processus de fusion est polarisé (Dumas et al., 2010). La fusion commence au niveau des pôles puis s'étend sur toute la surface du noyau. L'élément principal pour la fusion semble être les vésicules MV1 (Collas et Poccia, 1996). En effet, sans la présence des MV1, aucune fusion entre les vésicules ou les NERs n'est observée (Figure I-12B). Il a été montré que les vésicules MV1 avaient la capacité de fusionner aussi bien avec les NERs qu'avec les MV2 (Figure I-12B 1,5 et 7). Les membranes MV2 α fusionnent avec les NERs seulement en présence des vésicules MV1 (Figure I-12B 2 et 4). De même, les MV2 α fusionnent avec les MV2 β qu'en présence de MV1 (Figure I-12B 6 et 7). Cependant, la fusion des MV1 avec MV2 β nécessite également la présence de MV2 α . Les MV2 β ne fusionnent entre elles et avec les MV2 α qu'en présence de MV1 (Figure I-12B 3,5 et 7). Ceci montre bien la capacité des vésicules MV1 à initier les processus de fusion.

En raison de la forte implication des vésicules MV1 dans les processus de fusion, ainsi que de sa composition lipidique et protéique particulière, il a été proposé que la fusion serait déclenchée par la production de diacylglycérol (DAG) dans les membranes MV1 de l'hydrolyse de PI-4,5-P₂ par PLC γ . DAG a une forte courbure négative et a donc la capacité d'induire la formation de structures non-lamellaires (Basanez et al., 1996 ; Goñi et Alonso, 1999). De tels lipides (DAG, cholestérol, PE) favoriseraient les processus de fusion membranaire en facilitant la formation des intermédiaires de fusion (ceci sera vu plus en détails ultérieurement) (Basanez et al., 1996 ; Goñi et Alonso, 1999 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Churchward et al., 2006 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). Par conséquent, la production de DAG, dans les vésicules MV1, pourrait donc être impliquée dans les processus

de fusion observés lors de la formation de l'enveloppe nucléaire. Afin de confirmer le rôle éventuel de PLC γ (et donc de DAG) lors de la fusion membranaire, un certain nombre d'expériences ont été réalisées.

Dans un premier temps, il a été montré que la formation de l'enveloppe nucléaire est inhibée par traitement des vésicules MV1 avec une phosphatase 5. Cette enzyme, qui déphosphoryle de manière spécifique la position 5 du cycle inositol, va générer PI-4-P à partir de PI-4,5-P₂ (Barona et al., 2005 ; Byrne et al., 2005 ; Dumas et al., 2010), et donc supprimer (ou du moins diminuer) les lipides PIP₂ des vésicules MV1. Ceci indique un rôle de PIP₂ dans la formation de l'enveloppe nucléaire. De plus, PI-4,5-P₂ est majoritairement présent dans les MV1 sous la forme diacycle, qui est le substrat préférentiel de PLC γ (Byrne et al., 2007).

Dans un deuxième temps, il a été observé que PLC γ est activée après ajout de GTP au système (Byrne et al., 2007). L'inhibition de cette enzyme empêche la fusion des vésicules nécessaire à la formation de l'enveloppe (Byrne et al., 2007 ; Dumas et al., 2010). Ceci démontre un rôle de PLC γ dans la fusion. La formation de l'enveloppe nucléaire est observée lorsque les vésicules MV1 sont incubées en présence d'une phospholipase C d'origine bactérienne spécifique à PI (PI-PLC). Ceci indique que c'est la production de DAG qui déclencherait les mécanismes de fusion et non la formation de IP₃, molécule également générée lors de l'hydrolyse de PIP₂ par PLC γ (Larijani et al., 2001 ; Byrne et al., 2005). De plus, il a été montré que si on remplaçait les MV1 par des liposomes composés de DAG et de PC, ceux-ci étaient capables d'induire la fusion nécessaire à la formation de l'enveloppe nucléaire (Barona et al., 2005). Toutes ces constatations indiquent que les processus de fusion lors de la formation de l'enveloppe nucléaire seraient régis par l'activation de PLC γ qui va alors hydrolyser PIP₂ en DAG. La production de DAG déclencherait alors les processus de fusion. Le rôle de DAG pourrait être double. Il agirait comme molécule de signalisation activant des protéines impliquées dans les processus de fusion, mais aussi comme déstabilisateur de la structure membranaire facilitant la formation des intermédiaires de fusion (Byrne et al., 2009b).

Les NERs contiennent 42% molaire de cholestérol et 8% molaire de PE. Ces deux lipides sont connus pour faciliter les mécanismes de fusion membranaire, aussi bien dans les modèles membranaires que dans les membranes naturelles, grâce à leur faculté de former des objets à courbure négative (Chernomordik et al., 1995 ; Churchward et al., 2005). Il est donc supposé que le cholestérol et la PE présents dans les NERs permettent de faciliter la fusion entre les NERs et les MV1 (Garnier, 2007).

Une étude récente montre que la propagation de la fusion commence par la fusion des MV1 avec les MV2 avoisinantes puis les MV2 acquièrent la faculté de fusionner entre elles propageant ainsi la fusion le long de la surface du noyau (Dumas et al., 2010). Par ce mécanisme, la fusion des vésicules se régulerait d'elle-même (Larijani et Poccia, 2007 ; Larijani et Poccia, 2009 ; Dumas et al., 2010). En effet, lors de la fusion des MV1 avec les MV2, le DAG diffuserait ensuite le long des membranes permettant de propager la fusion autour du noyau. Au fur et à mesure, il y aurait un effet de dilution du DAG dans les membranes, régulant ainsi la fusion. D'après des études sur des systèmes modèles, lorsque la concentration en DAG passe sous le seuil de 4% de la concentration des lipides, il n'y a plus assez de DAG pour induire la fusion (Villar et al., 2001).

En dernier lieu, la formation de l'enveloppe nucléaire implique la formation des pores nucléaires puis l'importation des lamines au sein du noyau (Collas et Poccia, 1995a ; Collas et Poccia, 1995c ; Collas et al., 1996). Ces mécanismes ne sont pas encore bien identifiés. Les lamines vont ensuite polymériser afin de former la lamina et le noyau va gonfler. Ces processus nécessitent l'addition d'ATP au système.

En résumé, ce système *in vitro* est très puissant pour étudier les mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire pour de nombreuses raisons. La formation de l'enveloppe nucléaire *in vitro* ressemble fortement à celle observée *in vivo*. Ce système conserve l'étape de la décondensation de la chromatine. La formation de l'enveloppe nucléaire *in vitro* comme *in vivo* est sensible au pH et aux inhibiteurs de kinases et dépend du cytoplasme de l'œuf fécondé (Luttner et Longo, 1987 ; Cothren et Poccia, 1993). Les portions de membranes retenues à chaque pôle du noyau, puis incorporées dans l'enveloppe nucléaire *in vivo* sont également présentes dans les systèmes *in vitro* (Longo et Anderson, 1968 ; Collas et Poccia, 1995b).

d) Les mécanismes de fusion ou d'enveloppement par le réticulum endoplasmique ?

Le système que nous venons de décrire, implique des mécanismes de fusion membranaire. Cependant, dans les cellules somatiques, il existe aujourd'hui deux hypothèses de mécanismes de reformation de l'enveloppe nucléaire, soit une fusion de vésicules membranaires autour du noyau, soit un enveloppement du noyau par des extensions du réticulum endoplasmique (Larijani et Poccia, 2009). Ce deuxième processus est généralement décrit comme n'impliquant pas de processus de fusion membranaire. Ces deux mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire sont donc souvent présentés comme complètement exclusifs. Cependant, ces deux mécanismes seraient conciliables. En effet, les MV2

proviennent du réticulum endoplasmique et semblent être présentes sous forme de vésicules dans notre système de part la préparation des échantillons (Larijani et al., 2006). Nous ne pouvons donc pas exclure que dans le système *in vivo* les vésicules MV2 seraient directement des tubules du réticulum endoplasmique. Dans tous les cas, ces deux hypothèses s'accordent sur le fait que des membranes similaires au réticulum endoplasmique contribuent majoritairement à l'enveloppe nucléaire. De plus, nous pouvons également supposer l'existence *in vivo* de vésicules ayant des propriétés similaires aux vésicules MV1 de notre système (comme nous l'avons observé dans le cytoplasme de l'œuf fécondé) afin de permettre la fusion des membranes du réticulum endoplasmique, au niveau des espaces d'enveloppement, afin de former une enveloppe nucléaire continue.

I.3.2 La formation de l'enveloppe implique des processus de fusion membranaire

Nous venons de voir que la formation de l'enveloppe nucléaire implique des processus de fusion membranaire. Il apparaît donc utile de faire une description générale des mécanismes de fusion membranaire afin de pouvoir discuter ultérieurement du rôle éventuel des phosphoinositides présents dans les membranes MV1 et NERs dans la fusion.

Les mécanismes de fusion membranaire sont difficiles à appréhender. Cependant, un certain nombre d'informations sur ce processus ont été obtenus à partir d'études théoriques, d'études sur des modèles membranaires puis plus récemment à partir d'études sur des membranes naturelles. A ce jour, le modèle privilégié pour expliquer les mécanismes de fusion membranaire est le modèle d'hémifusion (Figure I-13).

a) Les différentes étapes du modèle d'hémifusion

Avant de fusionner, les membranes concernées doivent tout d'abord établir un contact (Zimmerberg et al., 1993 ; Basanez, 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et al., 2006 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Frolov et Zimmerberg, 2010). La distance initiale entre deux membranes est estimée à 10-20 nm (Figure I-13A). Pour que le contact entre les deux membranes puisse avoir lieu, un certain nombre de forces tenant les membranes éloignées (forces d'hydratation et répulsion électrostatique entre autre) doivent être compensées. Des protéines sont souvent impliquées lors de cette étape, afin de fournir l'énergie nécessaire pour forcer les membranes à se rapprocher et pour les courber localement afin de minimiser la surface de contact. (Zimmerberg et al., 1993 ; Basanez, 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Frolov et Zimmerberg, 2010).

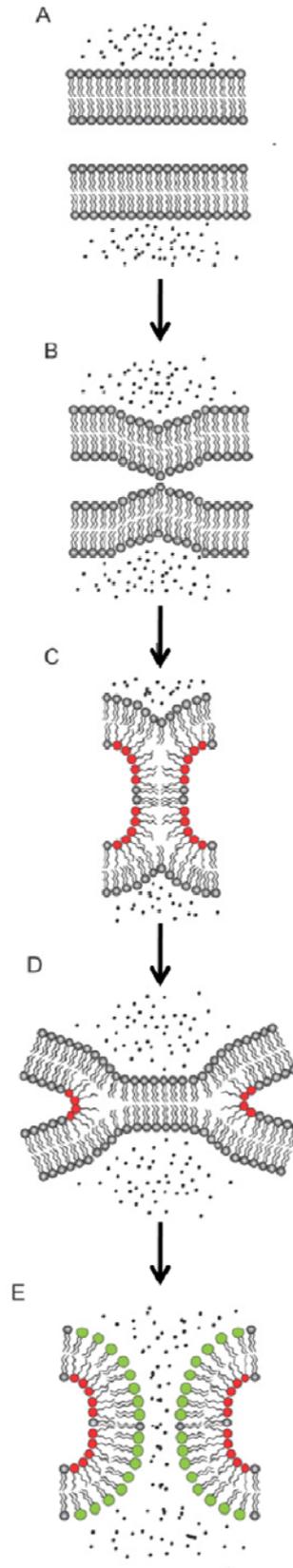


Figure I-13 Etapes du modèle d'hémifusion (adapté de Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Larijani et Poccia, 2009). Les lipides représentés en rouge indiquent les lipides à courbure négative tels que DAG, Cholestérol ou PE. Les lipides dessinés en vert correspondant aux lipides à courbure positive tels que les lysoPC. Les points noirs représentent le contenu des compartiments membranaires. (A) deux membranes séparées par 10-20 nm. (B) Les membranes devant fusionner rentrent en contact. (C) Formation du Stalk de fusion. (D) Expansion du « stalk » pour former le diaphragme d'hémifusion. (E) Ouverture du pore de fusion et mélange des contenus membranaires.

Cependant, ce processus est également observé en l'absence de protéines (Zimmerberg et al., 1993 ; Chernomordik et Kozlov, 1995 ; Cohen and Melikyan, 2004). En effet, les fluctuations thermiques des membranes peuvent engendrer localement un contact entre les membranes. (Figure I-13B). De telles structures ont été observées dans des systèmes biologiques (Longo et Anderson, 1968 ; Parsons et al., 1995). Comme nous pouvons le constater, ce premier intermédiaire de fusion implique une forte courbure membranaire (Cohen et al., 2004). La surface de contact est équivalente à celle d'une tête polaire d'un lipide. Cette configuration permet de minimiser les forces de répulsion entre les deux membranes, ces forces étant proportionnelles à la surface de contact impliquée (Efrat et al., 2007).

Une fois le contact entre les deux membranes établi, deux évolutions sont possibles. Soit le système retourne à son état d'origine, soit il évolue vers la formation d'un « stalk » (Zimmerberg et al., 1993 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et al., 2006 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). La structure moléculaire du « stalk » de fusion est représentée en figure I-13C. Le « stalk » est une connexion locale entre les deux monocouches proximales des membranes qui vont fusionner (Zimmerberg et al., 1993 ; Chernomordik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Kozlovsky et Kozlov, 2002). Les monocouches externes et internes des membranes interagissant sont fortement courbées. La courbure globale du « stalk » est négative (Chernomordik et al., 1995). Ceci laisse donc présager un rôle critique des lipides à courbure spontanée négative (nous y reviendrons ultérieurement). Il a été démontré que la formation du « stalk » de fusion ne nécessite finalement pas autant d'énergie qu'il avait d'abord été supposé (Kozlovsky et Kozlov, 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Cohen et Melikyan, 2004). Récemment, cet intermédiaire de fusion a été observé dans des modèles membranaires dépourvus de protéines (Yang et Huang, 2002).

Afin de terminer le processus de fusion, le « stalk » doit évoluer en pore de fusion. Cette transition peut se faire par deux voies, soit par une ouverture directe du pore soit par une progression du « stalk » en diaphragme d'hémifusion (bicouche formée des deux monocouches distales), suivi de l'ouverture du pore de fusion (Zimmerberg et al., 1993 ; Chernomordik, 1996 ; Cohen et al., 2004 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). L'ouverture du pore de fusion constituerait l'étape nécessitant le plus d'énergie (Cohen et Melikyan, 2004). La courbure globale du pore de fusion est positive (Chernomordik et al., 1995). Les lipides à courbure positive joueront donc un rôle important lors de cette étape (Zimmerberg et al., 1993 ; Chernomordik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008).

En résumé, le modèle d'hémifusion implique la formation d'intermédiaires de fusion fortement courbés. Ce processus devrait donc être favorisé par la présence de protéines interagissant avec les membranes et/ou la production des lipides possédant une importante courbure spontanée. Nous allons maintenant présenter quelques exemples illustrant le rôle des protéines puis le rôle des lipides.

b) Le rôle des protéines dans les mécanismes d'hémifusion membranaire

Des études sur différents organismes ont montré que les protéines seraient impliquées dans les différentes étapes du processus de fusion membranaire (Basanez, 2002 ; Jahn et al., 2003 ; Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et al., 2006 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Wickner et al., 2008 ; Frolov et Zimmerberg, 2010). Dans les membranes naturelles, plusieurs scénarios sont proposés afin d'expliquer la formation du «stalk» et/ou du pore de fusion assisté par des protéines (Figure I-14). On distingue les mécanismes de modification lipidique (Figure I-14A), de flambage membranaire (Figure I-14B), d'échafaudage externe (Figure I-14C), et enfin de manteau de fusion (Figure I-14D). Il s'agit ici de modèles proposés et leur validation est hypothétique.

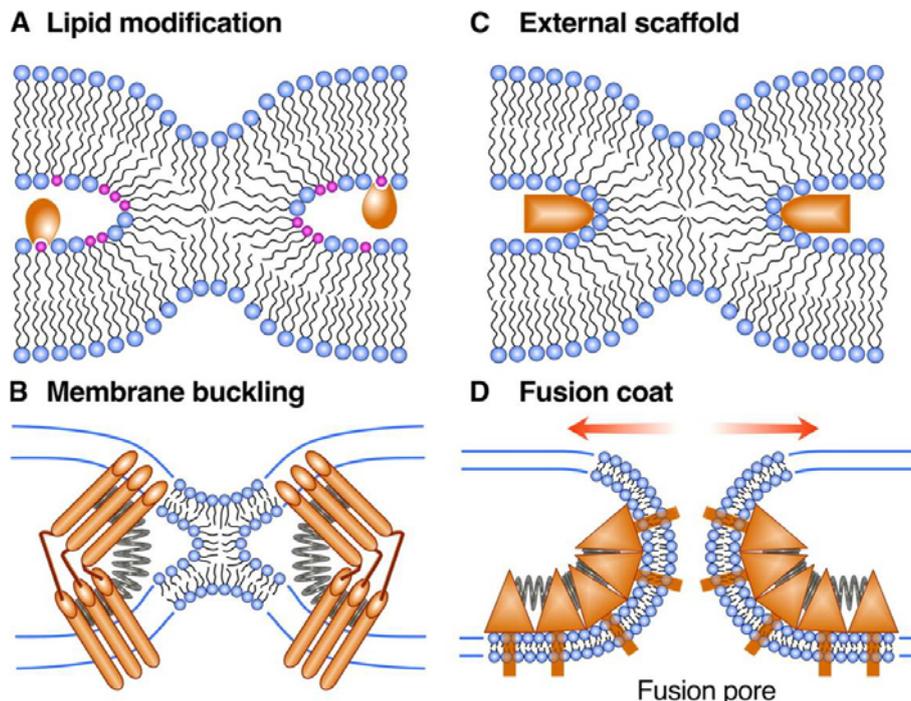


Figure I-14 Mécanismes par lesquels les protéines pourraient faciliter les processus de fusion (extrait de Chernomordik et al., 2006). A : Modification lipidique. Les protéines de fusion (orange) pourraient faciliter la formation du « stalk » en produisant localement des lipides fusogènes (rose) dans les membranes proximales (le même mécanisme peut être envisagé lors de l'étape d'ouverture du pore, non montré). B : Flambage membranaire. Les protéines de fusion peuvent fournir l'énergie nécessaire afin de courber les membranes afin de former le « stalk » de fusion. C : Echafaudage externe. Les protéines peuvent former un cercle autour du «stalk» et le stabilise via des interactions électrostatiques avec les lipides. D : Manteau de fusion. Des protéines à courbure négative recouvrent les membranes et induit la formation du pore.

Dans le modèle par modification lipidique, les protéines faciliteraient la fusion en produisant des lipides ayant une courbure spontanée importante (Chernomordik et Kozlov, 2006 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). Par exemple, ce processus serait impliqué lors de la formation de l'enveloppe nucléaire que nous avons présentée précédemment. En effet, la production de DAG par l'action d'une phospholipase serait suffisante pour déclencher les mécanismes de fusion (Larijani et al., 2001 ; Barona et al., 2005 ; Byrne et al., 2005 ; Byrne et al., 2007).

Dans le modèle de flambage membranaire (Figure I-11B), des protéines transmembranaires s'insèreraient dans les deux membranes devant fusionner. Un changement de conformation de ces protéines introduirait un stress de courbure important dans la membrane, ce qui conduirait alors à la formation du « stalk » (Chernomordik et Kozlov, 2006). Les protéines virales et les complexes SNARE suivraient ce modèle (Jahn et al., 2003).

Lors du modèle d'échafaudage externe (Figure I-11C), les protéines impliquées rentreraient en jeu après la formation du « stalk » de fusion (Chernomordik et Kozlov, 2006). Elles formeraient un échafaudage autour du « stalk » de fusion puis fourniraient l'énergie nécessaire afin d'étirer les membranes permettant ainsi l'expansion du « stalk » de fusion. Un diaphragme d'hémifusion se forme alors, pouvant évoluer rapidement en pore de fusion. Un tel mécanisme serait impliqué dans les processus d'exocytose synaptique (Rizo et al., 2006 ; Zimmerberg et al., 2006a).

Le dernier modèle permet de faciliter l'expansion du « stalk » de fusion en diaphragme d'hémifusion et/ou l'ouverture du pore de fusion. Les protéines impliquées recouvriraient la face externe du « stalk ». Ces protéines forceraient les membranes à se déformer par rapport à leur configuration présente dans le « stalk » afin de former le pore. Ces protéines pourraient également servir de stabilisateur de membrane courbée, ce qui faciliterait à terme l'étape d'ouverture du pore de fusion. Ces deux mécanismes proposés ne sont pas exclusifs et peuvent se produire simultanément lors du processus d'ouverture du pore de fusion (Zimmerberg et Kozlov, 2006b ; Frolov et al., 2010).

Nous venons de présenter brièvement dans quelle mesure les protéines pourraient faciliter les mécanismes de fusion. Lors de la présentation du modèle d'hémifusion, nous avons mentionné que les lipides pouvaient également faciliter les processus de fusion. Leur rôle dans les mécanismes de fusion est présenté ci-dessous.

c) Le rôle des lipides dans les mécanismes de fusion membranaire

Le rôle des lipides lors des mécanismes de fusion membranaire peut être double. En effet, ils peuvent favoriser la fusion membranaire en interagissant avec des protéines

impliquées dans les processus de fusion. Ces interactions permettraient alors le recrutement et/ou l'activation des protéines de fusion (Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Churchward et al., 2005 ; Zimmerberg et Kozlov, 2006 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Lang et al., 2008 ; Larijani et Poccia, 2009). Nous ne détaillerons pas ici ces phénomènes (pour plus d'informations se référer aux articles/revues cités précédemment). Les lipides peuvent être également engagés à travers un rôle structural dans les mécanismes de fusion (Chernomordik et al., 1995 ; Chernomordik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et al., 2006 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Lang et al., 2008 ; Frolov et Zimmerberg, 2010). Les lipides engendrant une courbure spontanée dans les membranes peuvent donc favoriser ou défavoriser la formation des intermédiaires de fusion par stabilisation ou déstabilisation de la courbure membranaire impliquée. De tels effets ont été démontrés pour un certain nombre de lipides aussi bien dans les mécanismes de fusion entre bicouches lipidiques des modèles membranaires que dans les processus biologiques.

Le « stalk » de fusion a une courbure nette négative (Chernomordik et al., 1995). Les lipides à courbure spontanée négative, tels que la PE, le DAG, le cholestérol, l'acide arachidonique (AA) et l'acide oléique (AO), pourraient donc faciliter la formation de cet intermédiaire de fusion. Ceci a en effet été constaté théoriquement et expérimentalement. Il a été observé que ces lipides promouvaient les processus de fusion lorsqu'ils étaient incorporés dans les membranes naturelles impliquées dans la formation du « stalk » (soit les deux monocouches proximales) (Chernomordik et al., 1995 ; Chernomordik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Lang et al., 2008). Les mêmes constatations ont été faites sur des modèles membranaires dépourvus de protéines, démontrant un rôle bien spécifique du lipide dans la fusion membranaire. Le rôle des lipides à courbure positive, tels que la lysoPC, sur la formation des « stalk » a également été étudié. Lorsque ces lipides sont ajoutés aux membranes proximales, on observe une inhibition de la formation du « stalk » et par conséquent de la fusion (Chernomordik et al., 1995 ; Chernomordik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Lang et al., 2008).

L'énergie nécessaire à la formation du « stalk » dépend fortement de la courbure spontanée des membranes impliquées lors de ce processus (Chernomordik et al., 1995 ; Basanez, 2002 ; Cohen et Melikyan, 2004). La courbure du stalk étant fortement négative, les lipides à courbure négative stabilisent le « stalk » en instaurant une courbure spontanée négative dans les membranes (Figure I-15). Ceci a donc pour effet d'abaisser l'énergie du « stalk » de fusion et ainsi de favoriser sa formation. Dans le cas des lipides à courbure spontanée positive, ils instaurent à la membrane une courbure allant à l'encontre de celle

retrouvée dans le « stalk ». Ceci a donc pour effet d'augmenter l'énergie nécessaire à la formation du « stalk » et donc inhibe sa formation.

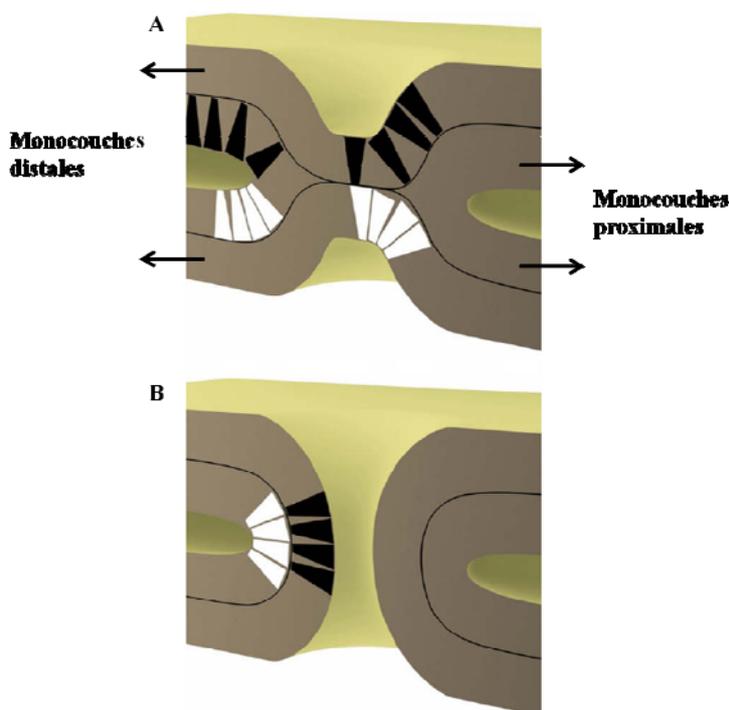
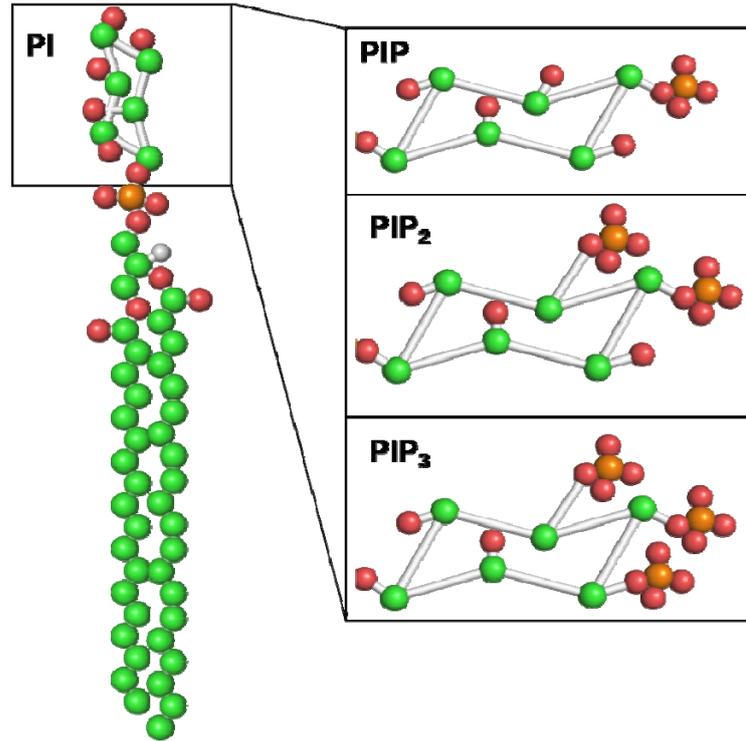


Figure I-15 Les lipides de forme conique peuvent influencer la formation des intermédiaires de fusion (adapté de Lang et al., 2008). Plus les lipides s'assemblent de manière compacte, plus la monocouche considérée sera stable. A : « Stalk » de fusion. Les lipides de forme conique (blanc) stabilisent la formation du « stalk ». B : les lipides de forme conique inversés (noir) stabilise la formation du pore de fusion lorsqu'ils sont incorporés dans les membranes distales.

Le « stalk » de fusion doit ensuite évoluer en un pore de fusion afin de terminer les processus de fusion. Il a été montré que la courbure nette du pore de fusion est positive (Chernomordik et al., 1995). Ceci implique que contrairement au « stalk » de fusion, les lipides à courbure positive devraient faciliter la formation de cet intermédiaire. En effet, il a été observé que les lipides à courbure spontanée positive promouvaient les processus de fusion lorsqu'ils étaient incorporés dans les monocouches distales des membranes devant fusionner (Chernomordik et al., 1995 ; Chernomordik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Lang et al., 2008). De plus, lorsque des lipides à courbure négatives étaient introduits dans ces mêmes monocouches, on avait alors inhibition de la fusion (Chernomordik et al., 1995 ; Chernomordik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). Ceci s'explique par le fait que les lipides à courbure positive instaurent dans la membrane une courbure positive allant dans le même sens que celle nécessaire à la formation du pore de fusion (Figure I-15). Ceci a pour effet d'abaisser l'énergie de formation du pore de fusion. Le mécanisme inverse explique l'inhibition de la fusion par les lipides à courbure spontanée négative.

A



B

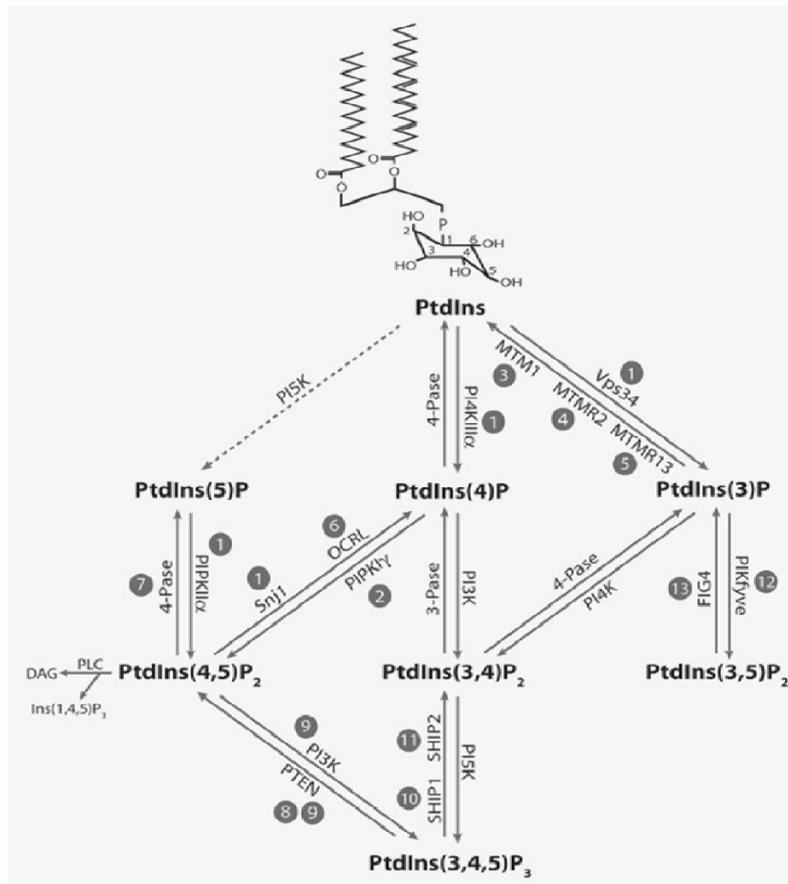


Figure I-16 Phosphoinositides et métabolismes (représentations des lipides extraites de www.avantilipids.com; Vincinanza et al., 2008). A : Structure moléculaire des phosphoinositides suivants : PI, PI-4-P, PI-4,5-P₂ et PI-3,4,5-P₃. B : Métabolisme des phosphoinositides. Le cycle inositol de PI peut être phosphorylé en position 3, 4 et 5. Ceci conduit à la formation de sept phosphoinositides.

Nous venons de voir que les lipides peuvent fortement influencer les processus de fusion, de part des interactions avec des protéines de fusion ou bien de part des propriétés physiques bien particulières. Lors de la formation de l'enveloppe nucléaire, les deux compartiments membranaires essentiels aux processus de fusion, MV1 et NERs, sont fortement enrichis en phosphoinositides (PPIs). Il est donc apparu intéressant de vérifier si ces lipides seraient impliqués dans les processus de fusion nécessaires à la formation de l'enveloppe nucléaire. Un état des lieux des connaissances sur les PPIs est alors nécessaire.

I.3.3 Etat des lieux des connaissances sur les phosphoinositides

Les phosphoinositides font partie de la classe des glycérophospholipides. Ces lipides sont généralement présents dans les membranes en très faible proportion (McLaughlin et al., 2002 ; Toker, 2002 ; Di Paolo et Di Camilli, 2006). Le précurseur de ces phosphoinositides est le phosphatidylinositol, phospholipide dont la tête polaire est constituée d'un cycle inositol (Figure I-16A). Le cycle inositol de PI peut être sujet à des phosphorylations réversibles au niveau des positions 3, 4 et 5 (Figure I-13B), conduisant à la formation de sept phosphoinositides : PI-3-P, PI-4-P, PI-5-P, PI-3,4-P₂, PI-3,5-P₂, PI-4,5-P₂, PI-3,4,5-P₃. Ces processus de phosphorylation/déphosphorylation sont régulés dans la cellule par de multiples phosphatases et kinases (Figure I-16B) (Payraastre et al., 2001 ; Toker, 2002 ; Parker, 2004 ; Di Paolo et De Camilli, 2006 ; Vincinanza et al., 2006).

a) Les PPIs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires

Les PPIs sont d'une importance capitale dans l'activation et/ou la régulation de nombreux processus cellulaires. Ils seraient notamment impliqués dans la formation de messagers secondaires, dans la formation et l'attache à la membrane du cytosquelette, dans la régulation des canaux ioniques (Payraastre et al., 2001 ; McLaughlin et al., 2002 ; Toker, 2002 ; Janmey et Lindberg, 2004 ; Di Paolo et De Camilli, 2006 ; Balla et al., 2009). Les PPIs sont également fortement impliqués dans les mécanismes cellulaires impliquant des processus de fusion membranaire tel que le trafic vésiculaire par exemple (Martin, 1997 ; Janmey et Lindberg, 2004 ; Di Paolo et De Camilli, 2006 ; Vincinanza et al., 2008 ; Poccia et Larijani, 2009). De nombreux domaines, capables de fixer spécifiquement ou non les PPIs, ont été mis en évidence : les domaines PH (« Pleckstrin Homology »), FYVE (nommés d'après les 4 protéines où ils furent découverts : Fab1p, YOTB, Vac1p et EEA1 : « Early Endosome Antigen 1 »), PX (PhoX) et ENTH (« Espin N-Terminal Homology ») par exemple (Toker, 2002 ; Parker, 2004 ; Balla et al., 2009). La fixation de ces lipides au niveau

de ces domaines de protéines permettrait de réguler et/ou d'activer le processus cellulaire impliqué.

Cette fixation permettrait un arrimage de la protéine à la membrane afin de la rapprocher de son substrat ou de son site d'action (McLaughlin et al., 2002 ; Janmey et Lindberg, 2004 ; Di Paolo et De Camilli, 2006 ; Balla et al., 2009). Par exemple, PI-3-P interagirait avec une protéine SNARE (« Soluble NSF Attachment Protein REceptors »), protéine régulatrice de fusion chez les vacuoles de levures. Ceci permettrait alors la concentration de cette protéine au niveau du site de fusion (Cheever et al., 2001). PI-4,5-P₂ interagit également avec CAPS-1 (protéine activant de manière calcium dépendante les processus d'exocytose), permettant ainsi de recruter cette protéine au niveau du site de fusion (James et al., 2008).

La fixation des PPIs sur une protéine pourrait également activer (ou inhiber) la protéine en question en induisant un changement de conformation ou un déploiement de la protéine (rôle de messenger secondaire dans ce cadre) (Janmey et Lindberg, 2004 ; Di Paolo et De Camilli, 2006 ; Vicinanza et al., 2006 ; Balla et al., 2009). Suivant les cas, cela déclencherait directement le processus cellulaire souhaité, ou bien activerait une cascade de réactions supplémentaires, nécessaires au déclenchement du processus cellulaire. Par exemple, il a été observé que l'activation de PLD (phospholipase hydrolysant les phospholipides en PA et qui a été impliquée dans la régulation du trafic membranaire intracellulaire processus de trafic vésiculaire) nécessite la fixation de PI-4,5-P₂ (Hodgkin et al., 2000). Les phosphoinositides régulent également l'activité des GTPases de la famille Rab (Di Paolo et De Camilli, 2006), qui elle-même régule un certain nombre d'étapes de la fusion membranaire (Poccia et Larijani, 2009).

Ces exemples montrent une implication des phosphoinositides dans la régulation et/ou l'activation des processus de fusion. Précédemment, nous avons mentionné que les lipides pouvaient également être impliqués dans les mécanismes de fusion membranaire à travers un rôle structural. Ceci pourrait être envisagé pour les PPIs. Néanmoins, peu d'études sur ce sujet concernant les PPIs ont été menées à ce jour.

b) Les propriétés physico-chimiques des phosphoinositides

❖ Les PPIs sont fortement chargés

Les phosphoinositides sont des phospholipides acides. Une fois phosphorylés, ils contiennent des groupements phosphates qui ont la faculté de s'ioniser en fonction du pH. La détermination des pKa (pH pour lequel une fonction acide a libéré 50% de ses protons) de ces

groupements phosphates s'est révélée complexe, notamment pour les phosphoinositides comportant plusieurs groupements phosphate adjacents, comme il est retrouvé dans certains PIP₂ et PIP₃. En effet, une étude récente a montré que les pKa des groupements phosphates des phosphoinositides PI-4,5-P₂, PI-3,4-P₂ et PI-3,4,5-P₂ ne pouvaient pas être déterminé par la méthode classique de Henderson-Hasselbach (Kooijman et al., 2009). Ceci s'explique par le biais d'une coopération entre ces groupements (partage du dernier proton entre les groupements vicinaux) engendrant une ionisation complexe de ces groupements.

PI aurait un pKa compris entre 2,5 et 3,5 en fonction des sels présents et de leur concentration dans la solution (Abramson et al., 1968). La constante de première ionisation (pKa₁) des groupements phosphates des PPIs phosphorylés est estimée à 3 (Van Paridon et al., 1986). Nous ne tiendrons compte par la suite que de la deuxième ionisation (pKa₂).

PI-4-P, sous forme de micelles, présenterait un pKa₂ de 6,3 et un pKa₂ de 6,1 lorsqu'il est incorporé dans une bicouche de PC (Van Paridon et al., 1986). Ceci montre que la valeur du pKa est également modifiée suivant l'environnement du lipide.

Plusieurs valeurs de pKa₂ pour PIP₂ ont été déterminées (Tableau I-4). Ces variations reflètent les différences entre les PIP₂ (différentes positions des groupements phosphates) ainsi que les différences expérimentales de ces mesures. Dans le cadre des PIP₂, comportant des groupements phosphates adjacents comme PI-3,4-P₂ et PI-4,5-P₂, les valeurs mentionnées ne tiennent pas compte du comportement biphasique de l'ionisation de ces groupements phosphates (les limitations techniques de l'époque ne permettaient pas d'observer ce comportement). Elles permettent donc de situer globalement l'ionisation des phosphates mais ne représentent pas le comportement réel.

A ce jour, aucune valeur des pKa₂ de PIP₃ n'a été répertoriée. Une étude du comportement d'ionisation des groupements phosphates de PIP₃ a révélé un comportement très complexe (Kooijman et al., 2009).

Bien que l'estimation des pKa₂ reste encore partielle, nous pouvons facilement admettre qu'à pH 7 (pH physiologique), les phosphoinositides sont des molécules chargées négativement. Globalement, le pKa₂ de ces lipides se situe entre 6 et 8. PI et PIP porteraient, respectivement, une et trois charges négatives à pH 7 (Tableau I-5). Pour PIP₂, une estimation de la charge globale de la molécule a révélé que PIP₂ porterait quatre charges négatives à pH 7 (Kooijman et al., 2009). Cette même étude estime que PIP₃ comporterait cinq charges négatives (dans les mêmes conditions). La phosphorylation du cycle inositol ainsi que la variation de la charge portée par les phosphoinositides peuvent engendrer un effet non négligeable sur les propriétés d'assemblage de ces lipides.

Lipides	pKa	pKa	Conditions	Références
PI-3,4-P ₂	(3 ou 4) 6,38	(3 ou 4) 8,45	Forme : micelles Contre-ions : Li ⁺ Force ionique : 0,1 M	Hendrickson et Fullington, 1965
PI-3,5-P ₂	(3) 6,96	(5) 6,58	Forme : vésicules (PC/PIP ₂ 95/5) Contre-ions : triammonium Force ionique : 100 mM NaCl	Kooijman et al., 2009
PI-4,5-P ₂	(4) 6,7	(5) 7,6	Forme: micelles Contre-ions : np Force ionique : np	Van Paridon et al., 1986
PI-4,5-P ₂	(4) 6,7	(5) 7,7	Forme: VU (PC/PIP ₂ 97/3) Contre-ions : np Force ionique : np	Van Paridon et al., 1986
PI-4,5-P ₂	(4) 7	(5) 7,7	Forme: VM (PC/ PIP ₂ 90/10) Contre-ions : triammonium Force ionique : 0,1 M KCl	Toner et al., 1988

Tableau I-4 Valeurs estimées des pKa₂ pour PIP₂. VU : vésicules unilamellaires ; VM : vésicules multilamellaires ; np : non précisé

	Charge estimée à pH 5	Charge estimée à pH 7	Charge estimée à pH 9
PI	-1	-1	-1
PIP	-2	-3	-3
PIP ₂	-3	-4*	-5
PIP ₃	-4	-5*	-7

Tableau I-5 Estimation de la charge des PPIs en fonction du pH. * : données extraites de Kooijman et al., 2009.

Ceci se comprend aisément par le modèle d'Israelachvili qui explique la propriété des lipides de s'assembler en tels ou tels objets (micelles, vésicules, phase hexagonale) suivant la forme du lipide (Israelachvili et al., 1980). Les PPIs possèdent une tête polaire de taille importante (cycle inositol). Cette tendance s'accroît avec la phosphorylation du PPI considéré. En effet, l'ajout d'un groupement phosphate sur le cycle inositol engendre un agrandissement de la taille de la tête polaire. De plus, si ce même groupement phosphate porte une ou deux charges (suivant le pH), ceci amplifie ce phénomène car la (ou les) charges engendrent un agrandissement de la taille effective des lipides, par le biais de la répulsion électrostatique qui en découle. Les PPIs pourraient donc être considérés comme des lipides possédant une forme conique inversée : peu marquée pour PI mais devenant de plus en plus marquée pour PIP, PIP₂ et PIP₃. De tels lipides ont la capacité de s'assembler sous forme de micelles (Israelachvili et al., 1980).

❖ Le polymorphisme des PPIs

A ce jour, relativement peu d'études ont été menées sur les propriétés d'assemblage des PPIs. Le PI (de source naturelle) formerait une phase lamellaire fluide lorsqu'il est dispersé en solution (Carrier et Wong, 1996 ; Mansour et al., 2001 ; Redfern et Gericke, 2004 ; Beshinger, 2005). Il a également été mentionné que PI induit une augmentation de la fluidité dans des membranes de PC (Larijani et Dufourc, 2006). Cet effet peut avoir un rôle non négligeable dans les mécanismes de fusion. En effet, la fusion nécessite de fortes déformations au sein de la membrane. Une augmentation de la fluidité induit une plus forte capacité des membranes à se déformer pouvant alors préparer les membranes aux mécanismes de fusion.

A notre connaissance, PIP pur n'a pas été encore étudié. PIP₂ formerait des micelles dans l'eau à pH neutre et à faible force ionique (Hirai et al., 1995 ; Hirai et al., 1996 ; Flanagan et al., 1997). Un effet de pH a été constaté. En effet, à pH 5,4, une phase lamellaire fluide a été observée pour PIP₂ (Hirai et al., 1995). L'ajout d'ions dans la solution altère de manière considérable les propriétés d'assemblage de ces lipides. En effet, il a été observé que l'ajout de Ca²⁺ à une dispersion de micelles de PIP₂ induisait la formation d'un large agrégat d'environ 1 µm (Takizawa et al., 1988 ; Flanagan et al., 1997). Une transition micelle/phase lamellaire fluide a également été observée sous l'action de Ca²⁺ (Hirai et al., 1996). Les ions en question peuvent former une liaison ionique avec les lipides, ceci ayant pour conséquence de diminuer la répulsion électrostatique entre les lipides. La taille effective de la tête polaire diminue alors et ceci conduit à un changement des propriétés d'assemblage des lipides. De plus, il a été montré que l'ajout de Ca²⁺ à des liposomes contenant des PPIs induisait la fusion

de ces liposomes (Summers et al., 1996 ; Müller et al., 2003). Les ions calcium induiraient une déshydratation de la surface membranaire par le biais de ponts ioniques entre les membranes et permettraient donc le contact entre les membranes.

Les PPIs sont supposés être de forme conique inversé (lipides à courbure positive). Les résultats, présentés ici, le confirment pour le cas de PIP₂ qui formerait des micelles lorsqu'il est fortement chargé. Nous avons mentionné que de tels lipides présentent la faculté de stabiliser la formation du pore de fusion en instaurant une courbure de membrane positive. Nous pouvons alors supposer que les PPI présents dans les membranes pourraient intervenir à ce stade de la fusion membranaire. Ceci pourrait être pertinent dans nos systèmes. En effet, MV1 et NERs sont fortement enrichis en PPIs et pourraient donc participer au travers d'un rôle structural dans la fusion entre ces deux compartiments membranaires. De plus, nous avons vu que l'action du pH ou de la force ionique ont des effets non négligeables sur les propriétés d'assemblage de ces lipides. Ces effets pourraient moduler les propriétés des PPIs et pourraient être impliqués dans la régulation des mécanismes de fusion.

Ces lipides auraient la capacité de se regrouper en domaines. Des études sur des systèmes binaires composés de PC et PPIs ont révélé la présence de domaines enrichis en PPIs (Takizawa et al., 1998 ; DeWolf et al., 1999 ; Liepina et al., 2003 ; Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et al., 2005 ; Hermelink et Brezesinski, 2008 ; Kooijman et al., 2009). En effet, Redfern et Gericke ont mis en avant l'existence de ces domaines dans des bicouches composées de PC et de PPIs par le biais de deux techniques : le transfert d'énergie par résonance de fluorescence et la spectroscopie infrarouge (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005). D'autres études ont également mentionné des domaines dans des monocouches mixtes composés de PC et PI (ou de PIP₂) par microscopie à l'angle Brewster et par microscopie de force atomique de balayage (DeWolf et al., 1999 ; Hermelink et Brezesinski, 2008). Des calculs de dynamique moléculaire ont montré le regroupement de PIP₂ lorsque ces lipides sont insérés dans une bicouche de PC (Liepina et al., 2003). Récemment, des études par RMN laissent également envisager l'existence d'un regroupement de PIP₂ dans une membrane de PC (Kooijman et al., 2009). Il serait évidemment intéressant de discuter des avantages et des inconvénients de chaque technique, mais cela dépasserait le cadre de ce travail. Néanmoins, le fait que plusieurs techniques tendent à montrer l'existence de ces domaines validerait ces observations.

La formation de ces domaines serait dépendante du pH et donc du degré d'ionisation des phosphoinositides (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et al., 2005). En effet, il a été

observé une séparation de phases plus importante à pH élevé (< 7), c'est-à-dire lorsque la charge des PPIs considérés augmente. De plus, une comparaison entre la faculté de ces lipides à induire une séparation de phase en fonction du nombre de groupement phosphate a révélé qu'à pH donné, PIP₂ et PIP₃ aurait une plus forte propension à former des domaines que PIP et PI (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et al., 2005). Le même constat a été obtenu entre PIP et PI, PIP formerait des domaines plus facilement que PI. La formation de tels domaines apparaît tout d'abord surprenante. En effet, ces molécules sont fortement chargées. Par répulsion électrostatique, on s'attendrait donc à ce qu'elles restent éloignées les unes des autres et non regroupées en domaine. De plus, on s'attendrait à observer un effet de répulsion plus fort pour PIP₂ comparé à PIP et PI (et plus fort pour PIP que pour PI). Cependant, comme mentionné précédemment, le contraire a été observé (DeWolf et al., 1999 ; Liepina et al., 2003 ; Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005 ; Hermelink et Brezesinski, 2008).

La formation de ces domaines a été attribuée à la formation d'un large réseau de liaisons hydrogène entre les phosphoinositides, qui permettrait de contrebalancer localement la répulsion électrostatique (Liepina and al., 2003 ; Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005 ; Levental et al., 2008a ; Levental et al., 2008b ; Kooijman et al., 2009). Ce phénomène de stabilisation de domaine par liaisons hydrogène de lipides chargés a déjà été mentionné pour le PA, la PS et le PG (Eibl and Wooley, 1979 ; Cevc et al., 1981 ; Garidel et al., 1997). Les PPIs possèdent des groupes donneurs (groupes hydroxyles sur le cycle inositol) et accepteurs (phosphomonoester, phosphodiester et hydroxyles disponibles sur les molécules voisines) d'hydrogène. Les PPIs seraient donc capables de former des liaisons hydrogène avec l'eau mais aussi avec les PPIs avoisinants (Figure I-17). Comme mentionné précédemment, la stabilisation des domaines formés est plus importante pour PIP₂ que pour PIP, puis que pour PI (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005). L'introduction d'un (ou deux) groupement phosphomonoester, au sein de la molécule, est donc une source supplémentaire de stabilisation, en augmentant le nombre possible de liaisons hydrogène.

Cette stabilisation par liaison H de molécules chargées est surprenante dans le sens où la répulsion électrostatique prédomine généralement sur les forces d'attractions, telles que les liaisons hydrogène. Cependant, il y a maintenant plusieurs évidences que dans certaines conditions, ces liaisons hydrogène prédominent au moins localement sur la répulsion électrostatique, permettant ainsi la formation de domaines enrichis en molécules chargées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les charges des têtes polaires inositolphosphates seraient dissipées à travers un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires diminuant la densité de charge au sein de la molécule, et la densité de charge locale serait encore réduite

par formation d'un réseau de liaisons hydrogène entre les phosphoinositides (Kooijman et al., 2009). La présence de contre-ions dans le système peut réduire la charge effective portée par les têtes polaires et donc dans ce cas, le grand nombre de liaisons H pouvant se former entre les phosphoinositides pourrait dominer. Il apparaît donc de plus en plus évident que le système se trouverait dans une sorte d'équilibre, certainement fragile et facilement déplaçable, entre des forces de répulsion et des forces d'attraction pouvant être modulées par différents paramètres tels que le pH et la force ionique du système.

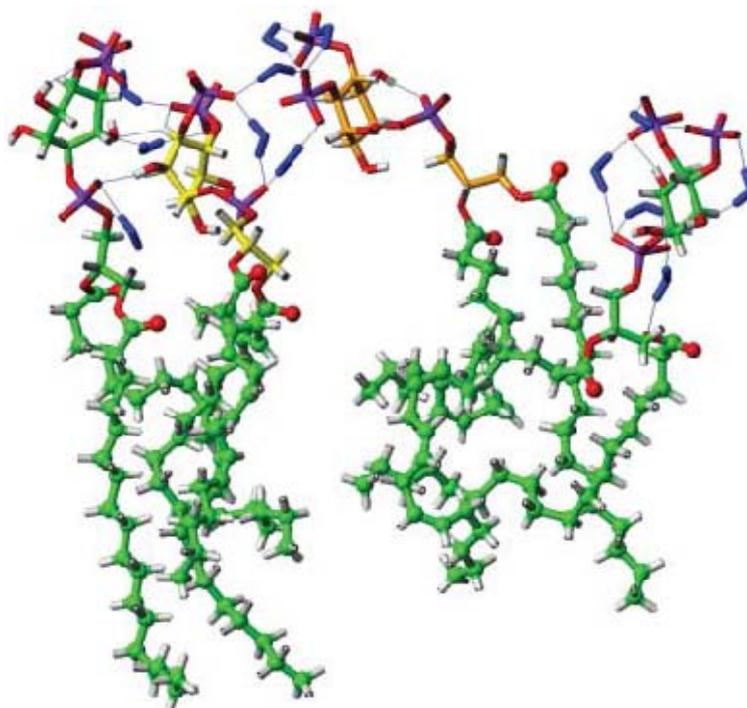


Figure I-17 Cluster de PI-4,5-P₂ (Lipiena et al., 2003). Détails moléculaires des liaisons hydrogène (liaisons reliant les lipides entre eux) stabilisant un cluster de quatre PIP₂ se trouvant dans une bicouche de PC. Résultats obtenus par dynamique moléculaire après 2 ns de simulation.

Les phosphoinositides (et plus particulièrement PIP₂ et PIP₃) étant considérés comme des lipides à courbure positive, nous pouvons nous attendre à des domaines enrichis en PPIs fortement courbés. Ceci pourrait là encore avoir un impact non négligeable sur les mécanismes de fusion membranaire et en particulier lors de la formation du pore de fusion.

En résumé, en plus de leur rôle bien connu de régulateur de fusion, nous venons de montrer que ces lipides pourraient également agir d'un point de vue structural dans les mécanismes de fusion membranaire. Ceci impliquerait une augmentation de la fluidité membranaire (montré pour PI) et une augmentation de la courbure de la membrane (courbure des PPI supposée positive pouvant être modulés en fonction de l'état de phosphorylation, du

pH et de la concentration en ions). Cependant, nous avons pu remarquer que peu d'études sur ces lipides ont été effectuées.

I.4 Objectifs et plan de thèse

Nous avons vu que les lipides pouvaient être fortement impliqués dans les processus de fusion membranaire, soit indirectement par des interactions avec des protéines spécifiques impliqués dans les processus de fusion, soit de manière plus direct par un rôle structural permettant de faciliter la formation des intermédiaires de fusion.

Dans notre système d'étude de la formation de l'enveloppe nucléaire, des processus de fusion membranaire ont été mis en évidence. En effet, la fusion entre les différents compartiments membranaires, MV1, MV2 et NERs est nécessaire afin d'obtenir une enveloppe nucléaire. Le pouvoir fusogène de ces membranes a été attribué aux membranes MV1 et NERs. Etonnamment, ces deux membranes sont fortement enrichies en phosphoinositides (et en cholestérol pour les NERs). Bien que l'élément déclencheur de la fusion soit l'hydrolyse de PIP₂ afin de former du DAG, nous nous sommes demandés si les PPIs présents en fortes proportions dans ces membranes (et ne servant pas tous de substrat pour PLC γ) pouvaient être impliqués dans la fusion d'une autre manière, notamment à travers un rôle structural. **L'objectif de ce travail est donc l'étude de l'implication des PPIs dans la formation de l'enveloppe nucléaire et en particulier dans les mécanismes de fusion.** Pour ce faire, cette étude a été divisée en trois parties distinctes et complémentaires.

La première partie portera sur l'étude du polymorphisme des PPIs dans l'eau en particulier en fonction de la température et du pH (Chapitre III). Cette étude se fera à l'aide de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire des solides appliquée aux membranes qui nous apportera des informations sur la structure et la dynamique de ces lipides dans l'eau. Ceci sera complété par une étude de ces systèmes par cryo-microscopie qui nous donnera des informations morphologiques de ces objets. Les techniques physico-chimiques utilisées dans le cadre de cette thèse sont présentées dans le chapitre II.

La deuxième partie portera sur l'effet des phosphoinositides sur des membranes modèles mimant la composition lipidique des MV1 (Chapitre IV). Cela se fera également par RMN des solides. Nous étudierons les propriétés structurales et dynamiques de ces membranes. Nous discuterons ensuite des résultats et montreront dans quelle mesure les informations obtenues peuvent être intégrées dans les mécanismes de fusion membranaire nécessaires à la formation de l'enveloppe nucléaire.

La troisième partie sera similaire à la deuxième (Chapitre V). Cependant, les modèles de membranes étudiés seront cette fois des modèles mimant la composition lipide des NERs.

Enfin, dans un chapitre de synthèse, nous discuterons dans quelle mesure nos résultats obtenus dans les trois parties peuvent être impliqués dans la formation de l'enveloppe nucléaire (Chapitre VI).

II. Techniques physico-chimiques utilisées

Au cours de cette thèse, nous avons eu recours à plusieurs techniques physico-chimiques allant de la formulation des lipides sous forme de liposomes, à l'utilisation de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et de la cryomicroscopie électronique. Dans le cadre de ce chapitre, nous allons présenter chacune de ces techniques.

II.1 Préparation des modèles membranaires

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé des vésicules multilamellaires (MLVs) comme modèles membranaires. Comme mentionné dans l'introduction, ces modèles présentent l'avantage d'une fabrication relativement simple et rapide, mais aussi d'être constitués de bicouches lipidiques, structure de base des membranes naturelles.

Tous les lipides que nous avons utilisés au cours de ce travail proviennent de chez Avanti polar Lipids Incorporation. Ils ont été utilisés sans purification préalable. Les lipides seront présentés au fur et à mesure de cette thèse.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la quantité de lipides et d'eau dont nous avons besoin. Cela dépend du taux d'hydratation souhaité, qui sera déterminé par un compromis entre un large excès d'eau (dédeutérée dans le cas des lipides deutérés) et une quantité suffisante de lipides permettant l'obtention d'un signal RMN correct. Le taux d'hydratation se calcule très facilement de la façon suivante :

$$H(\%) = \frac{m_{H_2O}}{m_{H_2O} + m_{lipides}} \quad (\text{II-1})$$

Tous les échantillons préparés présenteront un taux d'hydratation de 95%. Cela revient à peser 5 mg de lipides puis de les disperser dans 100 μ l d'eau. Pour les échantillons constitués de phosphoinositides purs, nous avons prélevé 1 mg du lipide en question et nous l'avons dispersé dans 20 μ l.

Les échantillons sont homogénéisés par agitation à l'aide d'un vibreur de type « vortex ». Ils sont ensuite soumis à plusieurs cycles chaud-froid. Ceci se fait par congélation à -80 °C dans l'azote liquide (environ 30s) puis réchauffement au bain marie à une température supérieure à la température de transition de phase du lipide considéré (environ 10 minutes). A la fin de chaque cycle, les échantillons sont de nouveau homogénéisés par agitation « vortex ». Le nombre de cycles dépend de la faculté du lipide en question à se disperser dans l'eau. A la fin, nous devons obtenir une suspension totalement homogène. Dans notre cas, trois cycles chaud-froid ont été suffisants. Ce protocole classique permet

d'obtenir des vésicules multilamellaires de taille hétérogène à l'échelle micrométrique (Lorin et al., 2004).

Dans le cas des MLV comprenant plusieurs lipides (comme ceux que nous utiliserons pour miner la composition lipidique des membranes MV1 et NERs), ces derniers sont tout d'abord co-solubilisés dans un solvant organique (généralement du chloroforme ou un mélange chloroforme/méthanol). Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un appareil de «speed vacuum». Nous obtenons ainsi un film lipidique. Celui-ci est ensuite repris dans un large excès d'eau puis lyophilisé. Cette opération est généralement répétée deux fois et permet d'éliminer les traces de solvants organiques piégés dans le film lipidique. Nous obtenons alors notre mélange sous forme de poudre, que nous allons ensuite hydrater suivant le protocole décrit précédemment.

II.2 La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) appliquée aux biomembranes

Dans le cadre de cette thèse, nous souhaitons étudier des modèles membranaires à l'aide de la RMN. Les membranes sont de larges édifices supramoléculaires de type cristal liquide. Ces larges structures sont anisotropes (dont les propriétés diffèrent suivant les directions de l'espace) et leur mouvement global est relativement lent par rapport à l'échelle de temps d'une expérience RMN (de l'ordre de la μ s). Ceci introduit alors une anisotropie des interactions RMN non négligeable que l'on retrouve sur les spectres (largeur importante des spectres). L'étude des membranes biologiques par RMN nécessite alors le recours à des techniques semblables à celles employées lors de l'étude des solides par RMN.

II.2.1 Principes généraux de la résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire est un phénomène physique qui s'applique aux atomes dont les noyaux possèdent un moment cinétique de spin, \vec{I} , non nul. Comme pour le cas des électrons, il est admis que les noyaux tournent sur eux-mêmes. On définit alors un opérateur de spin \hat{I} qui décrit le moment cinétique \vec{I} induit par cette rotation. Tous les noyaux, dont le nombre de spin est non nul, possèdent également un moment magnétique. Ce moment magnétique $\vec{\mu}$ caractérise les propriétés magnétiques du noyau. Les opérateurs de spin associés à ces deux moments sont reliés par la relation suivante :

$$\hat{\mu} = \gamma \hat{I} \quad (\text{II-2})$$

dans laquelle γ est le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau et $\hbar = h/2\pi$, h la constante de Planck.

Lorsqu'une population de spins nucléaires \vec{I} est placée dans un champ magnétique statique \vec{B}_0 , celle-ci est soumise à plusieurs interactions. Ces interactions se divisent en deux parties : les interactions externes et les interactions internes. La contribution externe traduit l'interaction entre le noyau et l'environnement extérieur (champ magnétique appliqué), tandis que la contribution interne provient de l'interaction entre le noyau considéré et les autres noyaux présents dans le système (champs locaux dans l'échantillon). Les couplages des spins nucléaires avec leur environnement sont décrits à l'aide du concept d'hamiltonien de spins nucléaires \hat{H} (opérateur énergie) développé par Abragam (Abragam, 1961). Cet hamiltonien se décompose en la somme d'un hamiltonien de couplage externe et un hamiltonien relatif aux couplages internes :

$$\hat{H} = \hat{H}_{ext} + \hat{H}_{int} \quad (\text{II-3})$$

a) Le couplage externe de Zeeman

En l'absence de champ magnétique, les spins nucléaires ont une orientation aléatoire. La résultante magnétique est donc nulle et les spins présentent tous la même énergie. En revanche, en présence d'un champ magnétique statique \vec{B}_0 , il y a alors aimantation des spins nucléaires (orientation des spins par rapport au champ magnétique).

L'effet Zeeman provient du couplage entre les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}$ des noyaux et le champ magnétique statique \vec{B}_0 (parallèle à l'axe z). Ce couplage est décrit par l'hamiltonien \hat{H}_0 :

$$\hat{H}_0 = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\gamma \hbar \hat{I}_z \hat{B}_0 \quad (\text{II-4})$$

où \hat{I}_z représente l'opérateur de spin dans la direction z parallèle à \vec{B}_0 . L'énergie de l'hamiltonien Zeeman est de la forme :

$$E_m = -\gamma m \hbar B_0 \quad (\text{II-5})$$

où m correspond au nombre quantique magnétique, dont les valeurs possibles sont comprises entre -I et +I variant par pas de un (soit nombre de valeurs de 2I+1). Nous constatons alors qu'en présence d'un champ statique \vec{B}_0 , il y a une levée de la dégénérescence de l'énergie en 2I+1 niveaux. C'est ce que l'on appelle l'effet Zeeman (du nom de son découvreur, Peter Zeeman, prix Nobel de physique en 1902).

Une transition entre ces états d'énergie est possible si la loi de Bohr ($\Delta E = h\nu$) est respectée et si $\Delta m = \pm 1$. Cette transition se traduit par l'observation d'une seule raie de résonance qui se produit à la fréquence ν .

$$\Delta E_m = h\nu = \gamma \hbar B_0 \quad (\text{II-6})$$

Ceci amène à :

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{II-7})$$

Or, nous savons que lorsque les spins nucléaires sont soumis à un champ magnétique, ceux-ci précessent autour de l'axe principal du champ magnétique à une fréquence dite fréquence de Larmor ν_0 (pulsation de Larmor ω_0) définie par:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} = \hbar\omega_0 \quad (\text{II-8})$$

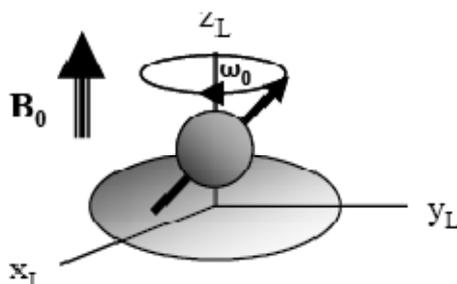


Figure II-1 Précession d'un spin nucléaire autour de l'axe directeur de \vec{B}_0 (image extraite de Loudet, 2006). En l'absence de perturbation, les spins nucléaires précessent autour de l'axe du champ magnétique avec une pulsation ω_0 .

Nous constatons alors que la fréquence nécessaire afin de permettre une transition est similaire à la fréquence de précession du noyau dans le champ magnétique, d'où le terme couramment employé de fréquence de résonance.

Dans ce qui suit, nous nous limiterons à l'approximation des champs forts, c'est-à-dire au cas où l'interaction de Zeeman domine les autres couplages (Abragam, 1961). L'axe de quantification des spins sera donc défini par \vec{B}_0 et les couplages internes seront traités comme des perturbations des niveaux d'énergie de Zeeman.

b) Les couplages internes

L'hamiltonien relatif aux interactions internes décrit le couplage entre les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}$ et les champs locaux présents dans l'échantillon (Mehring, 1983) :

$$\hat{H}_{int} = \hat{H}_\sigma + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (\text{II-9})$$

L'hamiltonien \hat{H}_σ est lié au couplage entre le moment magnétique du noyau et le champ magnétique local induit par le nuage électronique entourant le noyau sous l'effet du champ magnétique statique. Cette interaction, encore appelée, blindage électronique, est dépendante de B_0 . Les électrons qui circulent autour du noyau, créent un champ magnétique local de signe opposé au champ magnétique global B_0 (cas des atomes diamagnétiques). Un noyau isolé est donc partiellement « protégé » du champ B_0 par ses électrons. Lorsque ces mêmes électrons sont engagés dans des liaisons chimiques, la densité électronique autour du

noyau est alors diminuée et le noyau ressent de manière plus importante le champ magnétique global. On dit alors que le noyau est déblindé.

L'hamiltonien \hat{H}_J décrit le couplage entre les moments magnétiques de deux noyaux d'une même molécule. Cette interaction se fait par l'intermédiaire des électrons de liaisons. Ce couplage est donc purement interne à une molécule. On parle de couplage spin-spin indirect ou encore de couplage scalaire. Cette interaction est indépendante de l'intensité de B_0 et peut être homo- ou hétéro- nucléaire.

L'interaction dipolaire, \hat{H}_D , est associée au couplage entre deux dipôles magnétiques $\vec{\mu}_A$ et $\vec{\mu}_B$ relatifs aux noyaux A et B, respectivement, voisins dans l'espace (contrairement au couplage spin-spin indirect, celui-ci ne se fait pas par l'intermédiaire de liaisons). On parle de couplage spin-spin direct. Ce couplage est indépendant du champ magnétique B_0 mais dépend de la distance entre les noyaux A et B (il décroît rapidement avec la distance r_{AB}) ainsi que de l'angle entre ces deux noyaux. Cette interaction peut être homo- ou hétéro- nucléaire.

L'interaction quadrupolaire, \hat{H}_Q , apparaît pour les noyaux de spin supérieurs à $1/2$. De tels noyaux possèdent alors un moment quadrupolaire. Cette interaction traduit le couplage entre le moment quadrupolaire du noyau et le gradient de champ électrique (GCE). Le GCE est créé par les charges extérieures au noyau (électrons, ions...). Le couplage quadrupolaire est indépendant du champ magnétique B_0 .

D'après les équations II-3 et II-9, l'hamiltonien total d'un spin nucléaire placé dans un champ magnétique s'écrit alors de la manière suivante:

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_J + \hat{H}_\sigma + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (\text{II-10})$$

Il est important de mentionner que toutes ces interactions ne sont pas équivalentes. Elles dépendent en effet du type de noyau étudié, ainsi que des propriétés physico-chimiques de l'échantillon (en particulier de sa dynamique). Selon que les systèmes soient de type « solides », anisotropie des interactions internes, ou de type « liquides », interactions isotropes, certaines composantes de l'hamiltonien total seront privilégiées. Le tableau II-1 présente les ordres de grandeur en hertz (Hz) des hamiltoniens.

	\hat{H}_z	\hat{H}_J	\hat{H}_σ	\hat{H}_D	\hat{H}_Q
Solides	10^8	10^2	10^4 anisotrope	10^4	10^6 ($I > 1$) 0 ($I < 1$)
Liquides	10^8	10^2	10^4 isotrope	0	0

Tableau II-1 Ordre de grandeur en Hertz des différents hamiltoniens pour des systèmes de type solides et liquides.

Dans les systèmes « liquides », les contributions des interactions dipolaires et quadrupolaires sont nulles. Ceci s'explique par la dynamique importante des noyaux dans de tels systèmes qui moyenne alors la dépendance orientationnelle de ces interactions. Le même principe s'applique pour l'anisotropie de déplacement chimique où dans le cas d'un système « liquide », nous obtenons plus qu'une contribution isotrope. La contribution de l'anisotropie de déplacement dépendante de l'orientation y est moyennée.

On parle alors communément de la RMN des liquides et de la RMN des solides. En RMN des liquides, les temps de relaxation (décrivant le retour à l'équilibre) sont relativement longs (de l'ordre de plusieurs secondes). De plus, les interactions présentes sont le blindage électronique et le couplage de spin-spin indirect. La fenêtre spectrale de détection sera donc relativement petite (de l'ordre de quelques kHz). En RMN des solides, les temps de relaxation sont relativement courts (pouvant atteindre la milliseconde dans le cas du deutérium). Les interactions observées comprennent donc l'anisotropie de déplacement chimique, le couplage dipolaire et le couplage quadrupolaire pour les spins supérieurs à $\frac{1}{2}$. Ceci implique que la fenêtre de détection est beaucoup plus importante (pouvant atteindre les 500 MHz).

Dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons essentiellement la RMN des solides appliquée à l'étude de milieu membranaire.

II.2.2 La RMN des biomembranes

Le noyau le plus intéressant en RMN est généralement le proton. Ceci vient du fait qu'il est très abondant naturellement et qu'ainsi, sa détection est aisée. Cependant, il est très peu utilisé dans l'étude des membranes. Dans les bicouches lipidiques, il existe des milliers de protons non-équivalents. Les raies individuelles de chaque proton sont très larges. Il est donc impossible de les identifier. Nous rencontrons les mêmes difficultés avec le carbone 13 (couplées à une faible abondance naturelle), un autre noyau couramment utilisé en RMN.

Il a donc été nécessaire de trouver des noyaux permettant l'étude des membranes par RMN. Il a été observé que les noyaux phosphore (^{31}P) et deutérium (^2H) pouvaient être utilisés, facilement.

a) Le phosphore-31 : Anisotropie de déplacement chimique

Le phosphore est naturellement présent au niveau des têtes polaires de tous les phospholipides. Son étude ne nécessite donc pas un marquage préalable au phosphore des molécules. De plus, l'abondance naturelle du phosphore-31 est proche des 100%, permettant

ainsi une bonne détection sans marquage isotopique préalable. Il constitue donc un bon candidat pour sonder la dynamique à l'interface des membranes.

❖ *Cas général*

Le phosphore est un noyau de spin $\frac{1}{2}$. Les interactions prédominantes sont donc : l'effet Zeeman, l'anisotropie de déplacement chimique et le couplage dipolaire phosphore-proton. Cette dernière peut être facilement éliminée à l'aide d'un découplage protons. Nous ne considérerons plus que les interactions liées à l'effet Zeeman et au blindage électronique.

Les électrons circulant autour du noyau de phosphore créent un champ magnétique local opposé au champ magnétique B_0 . On parle alors d'effet d'écran. De ce fait, le champ effectif perçu par les noyaux s'exprime grâce à la relation :

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 - \sigma \vec{B}_0 = \vec{B}_0(1 - \sigma) \quad (\text{II-11})$$

où σ est le tenseur d'écran (encore appelé tenseur d'anisotropie de déplacement chimique). Le nuage électronique autour du noyau (cause de l'effet d'écran) dépend du mode de liaison du noyau phosphore avec ses voisins et présente généralement un caractère anisotrope. Ceci induit un effet d'écran également anisotrope. De ce fait, σ s'exprime alors sous forme d'un tenseur. Lorsque celui-ci est exprimé dans son système d'axe principal, il est alors diagonal:

$$\begin{bmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{bmatrix} \quad (\text{II-12})$$

où σ_{xx} , σ_{yy} et σ_{zz} sont les valeurs propres du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique.

L'hamiltonien total pour les noyaux phosphore-31 s'écrit alors (Dufourc et al., 1992):

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_\sigma = -\gamma \hat{I}_z \hat{B}_0(1 - \sigma) \quad (\text{II-13})$$

Dans le référentiel du laboratoire, celui-ci s'exprime par la formule suivante :

$$\hat{H} = -\hbar \omega_0 \hat{I}_z \left\{ 1 - \sigma_{iso} - \frac{2}{3} \Delta \sigma \left[\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2} \cos 2\alpha \sin^2 \beta \right] \right\} \quad (\text{II-14})$$

Cet hamiltonien fait apparaître les angles α et β qui sont les angles d'Euler permettant le passage des axes principaux du tenseur vers les axes du référentiel du laboratoire. σ_{iso} est la moyenne isotrope du tenseur d'écran :

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \sigma_{ii} \quad (\text{II-15})$$

$\Delta \sigma$ représente l'anisotropie de déplacement chimique et est donné par la relation suivante :

$$\Delta \sigma = \sigma_{zz} - \frac{(\sigma_{xx} + \sigma_{yy})}{2} \quad (\text{II-16})$$

η est le paramètre d'asymétrie du tenseur :

$$\eta = \frac{(\sigma_{xx} - \sigma_{yy})}{\sigma_{zz}} \quad (\text{II-17})$$

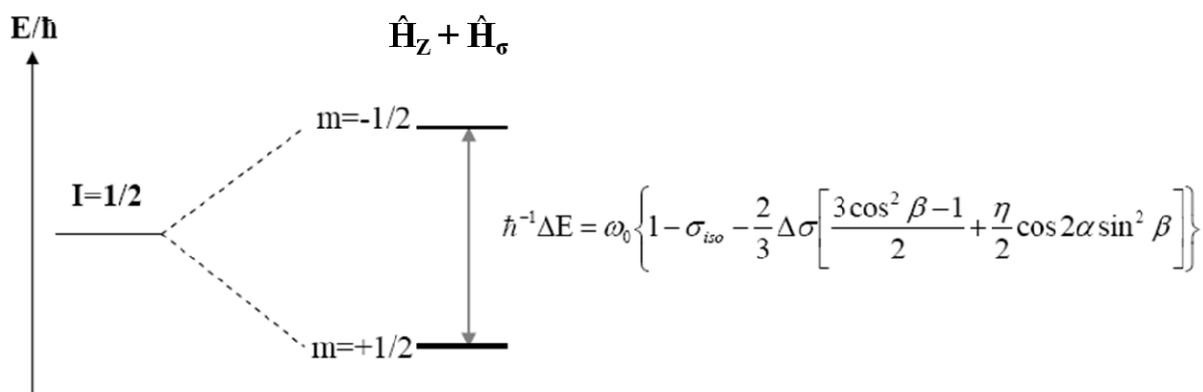


Figure II-2 Niveaux d'énergie associés à un spin $\frac{1}{2}$ soumis aux interactions de Zeeman et d'anisotropie de déplacement chimique.

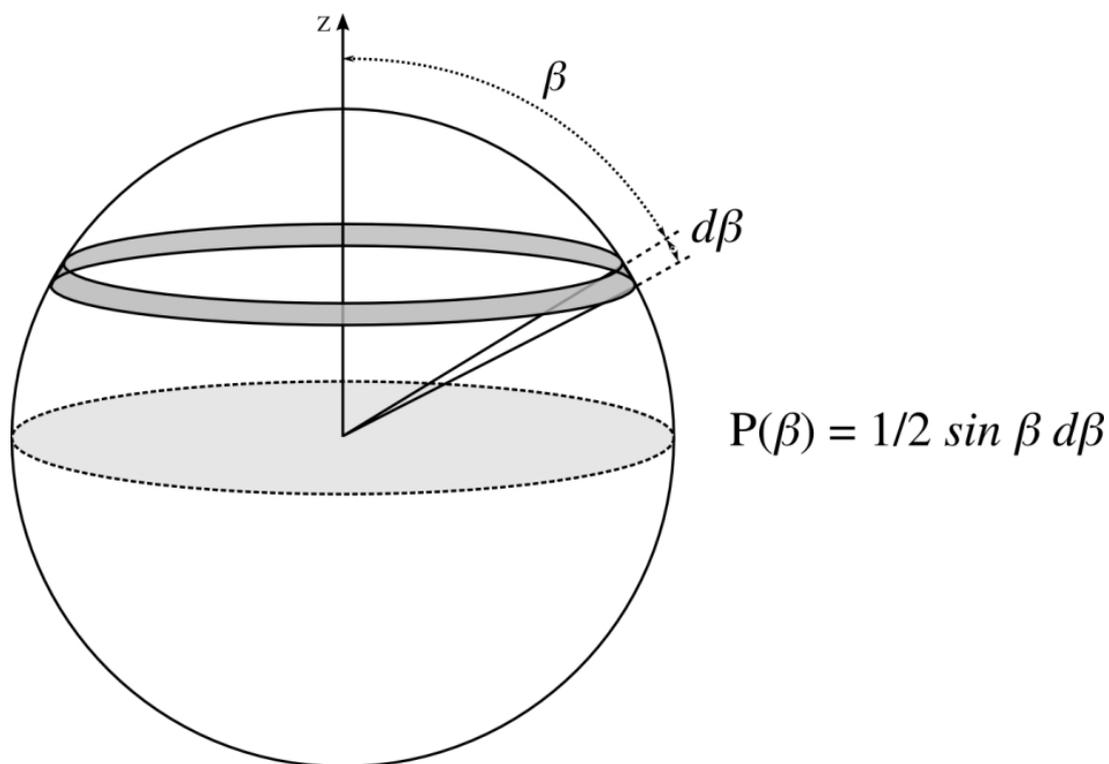


Figure II-3 Représentation de la distribution sphérique des axes z associés aux tenseurs d'anisotropie de déplacement chimique des atomes de phosphore dans le cas d'un échantillon polycristallin.

Une fois l'hamiltonien établi, les niveaux d'énergie associés à celui-ci peuvent être calculés (Figure II-2). Dans ce cas ($I=1/2$), il n'existe que deux niveaux d'énergie et par conséquent une seule transition est possible. La différence entre ces niveaux d'énergie donne la fréquence de résonance du noyau phosphore. Une dépendance orientationnelle (par rapport au champ) de la fréquence de résonance est alors constatée (Figure II-2). La conséquence directe est donc une dépendance orientationnelle des spectres RMN du phosphore.

❖ Les cristaux

Dans une poudre cristalline (constituée d'une multitude de monocristaux), les noyaux phosphore sont orientés de manière aléatoire par rapport au champ magnétique. Les axes principaux (notés ici z) de tous les tenseurs d'anisotropies de déplacement chimique sont distribués sur la surface d'une sphère (Figure II-3). La probabilité d'avoir cet axe z orienté entre β et $d\beta$ (β étant l'angle formé entre l'axe principal du nuage électronique du phosphore et le champ magnétique B_0) est donnée par :

$$P(\beta) = \frac{1}{2} \sin \beta \cdot d\beta \quad (\text{II-18})$$

Par conséquent, le spectre de RMN du phosphore, pour une poudre polycristalline, se présente comme la superposition des fréquences de résonance provenant des diverses orientations des monocristaux par rapport à \vec{B}_0 , et pondérées par leur probabilité d'existence. La figure II-4a présente un spectre obtenu dans le cas d'une poudre de phospholipides. On parle alors couramment de spectre de poudre. Ce spectre permet d'accéder aux valeurs des composantes principales du tenseur d'écran (σ_{xx} , σ_{yy} , σ_{zz}) en considérant la fréquence des épaules du spectre ainsi que le pic central.

❖ Les bicouches lipidiques

Lorsque les lipides sont impliqués dans une bicouche en phase fluide, ces derniers présentent un certain nombre de mouvements anisotropes. Ceci va provoquer des modifications dans la forme du spectre de poudre (Figure II-4b et c). Les phospholipides tournent rapidement sur eux-mêmes et possèdent donc un axe principal de rotation le long de la molécule. Ce mouvement de rotation rapide, colinéaire à la normale de la bicouche \vec{n} , confère aux lipides une symétrie axiale ($\eta = 0$). Dans ce cas, les composantes suivants x et y (perpendiculaire à l'axe principal, z) deviennent identiques. L'axe z est lui colinéaire à l'axe du mouvement. Ceci simplifie alors le tenseur statique (équation II-12) en un tenseur résiduel exprimé dans le référentiel lié à la bicouche (l'axe z étant parallèle à \vec{n}):

$$\sigma = \begin{bmatrix} \sigma_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{\parallel} \end{bmatrix} \quad (\text{II-19})$$

La partie isotrope σ_{iso} de ce tenseur est définie par (formule générale II-15):

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3}(\sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp}) \quad (\text{II-20})$$

L'anisotropie de ce tenseur est définie par (formule générale II-16):

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \quad (\text{II-21})$$

Nous venons de mentionner que les lipides dans les bicouches présentent une symétrie axiale induisant $\eta = 0$. Par conséquent, la fréquence de résonance du phosphore dans des vésicules non orientées de phospholipides est donnée par (déterminée à partir de l'équation présentée dans la figure II-2):

$$\nu(\beta) = \nu_0 \left[1 - \sigma_{iso} - \frac{2}{3} \Delta\sigma \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \right] \quad (\text{II-22})$$

Les spectres seront alors composés de la superposition de différentes fréquences de résonance (obtenues pour les différents β) pondérées par leur probabilité d'existence. Nous constatons alors que l'orientation la moins favorable est obtenue pour $\beta = 0^\circ$ (soit l'orientation parallèle à \vec{B}_0) et la plus favorable pour $\beta = 90^\circ$ (soit l'orientation perpendiculaire à \vec{B}_0). L'anisotropie de déplacement chimique peut être directement mesurée sur les spectres en considérant les positions extrêmes des fréquences de résonance qui correspondent à $\beta = 0^\circ$ et $\beta = 90^\circ$ (grâce à l'équation II-21):

$$\Delta\sigma = \Delta\nu(90^\circ) - \Delta\nu(0^\circ) = \Delta\nu_{\perp} - \Delta\nu_{\parallel}$$

La forme des spectres RMN du phosphore donne par conséquence des informations sur la dynamique et l'organisation des phospholipides dans les membranes. La figure II-4 représente la forme des spectres RMN du phosphore obtenus pour des lipides engagés dans divers types de phase. Comme il a déjà été présenté, le spectre a) montre le spectre obtenu dans le cas d'une poudre de phospholipides.

Les spectres b) et c) présentent les spectres obtenus pour des lipides dans des bicouches en phase gel et en phase fluide, respectivement. Même à l'état gel, la rotation du groupement phosphate dans la bicouche est assez rapide pour induire la symétrie axiale (Figure II-4b).

Lors de la transition gel/fluide, des mouvements d'oscillations autour de l'axe de rotation apparaissent. L'anisotropie de déplacement chimique va alors diminuer et la forme spectrale va s'affiner (Figure II-4c).

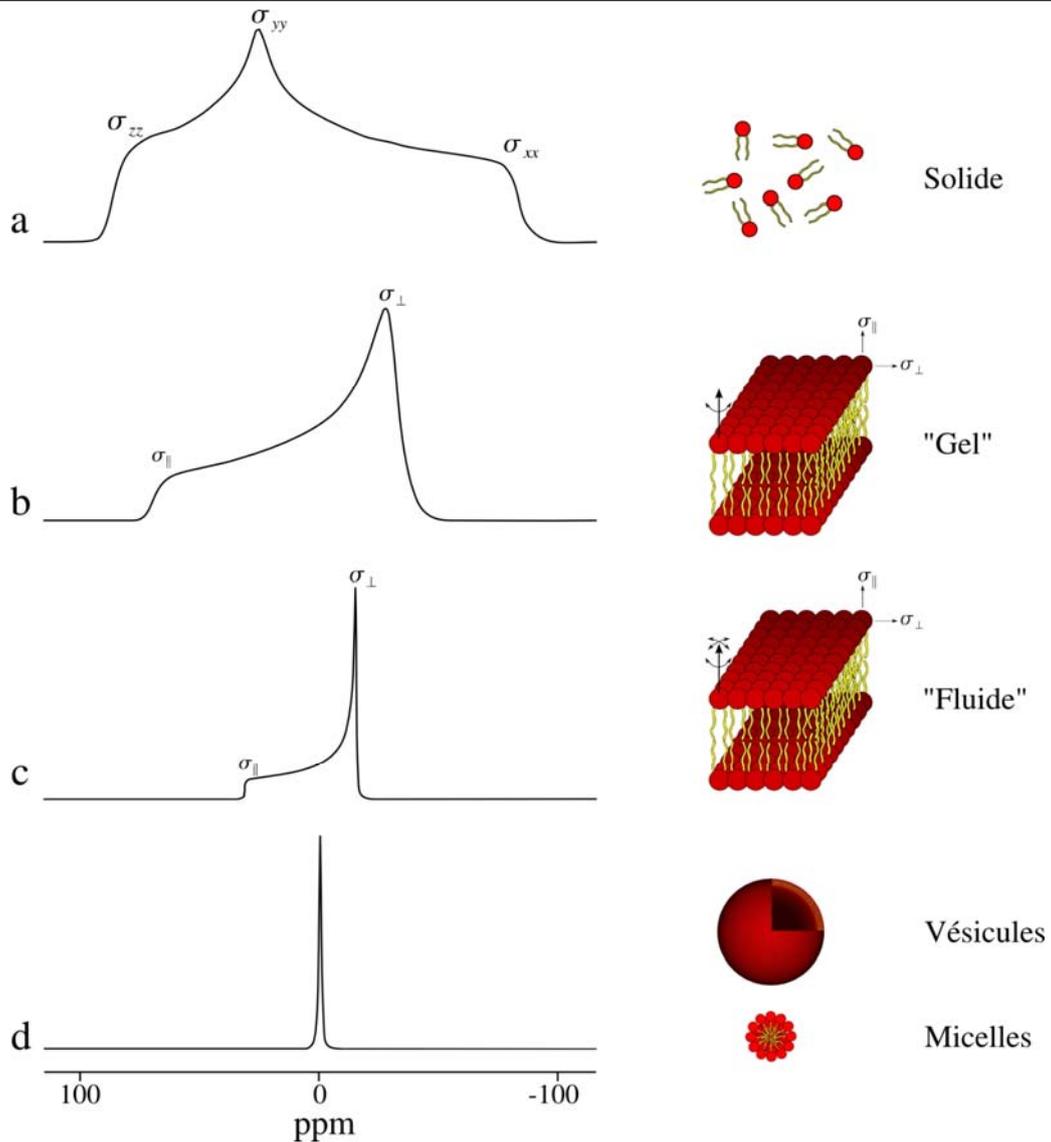
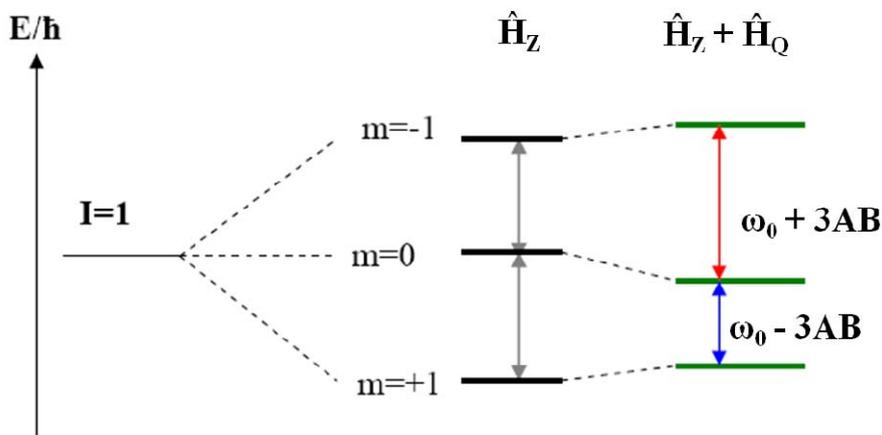


Figure II-4 Spectres RMN du phosphore en fonction de la phase lipidique (image extraite de Buchoux, 2008 ; adaptée de Dufourc, 1986).



$$\text{où } A = \frac{e^2 Qq}{4\hbar} \text{ et } B = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2} \cos 2\alpha \sin^2 \beta$$

Figure II-5 Niveaux d'énergies associés à un spin 1 soumis aux interactions Zeeman et quadrupolaire.

Si maintenant les lipides sont engagés dans des objets de petites tailles (type SUV ou micelles), nous obtenons un spectre dit isotrope (Figure II-4d). Ceci provient de la dynamique très rapide de tels objets qui engendre une moyennation de l'anisotropie de déplacement chimique. Le tenseur d'écran s'exprime alors simplement via sa composante isotrope.

b) Le deutérium : Interaction quadrupolaire

L'abondance naturelle du deutérium est très faible. Cependant, ses propriétés en font un marqueur privilégié des lipides. Son utilisation nécessite néanmoins un marquage préalable au deutérium.

❖ Généralités

L'atome de deutérium possède un spin nucléaire $I = 1$. Ceci implique qu'il présente un moment électrique quadrupolaire, noté eQ , où e est la charge élémentaire de l'électron et Q le moment quadrupolaire du noyau. Avec ce type de noyau, l'interaction interne qui prédomine est l'interaction quadrupolaire, qui traduit le couplage entre le moment quadrupolaire du noyau et le GCE. Dans le référentiel du laboratoire, l'hamiltonien total s'écrit (Davis, 1983) :

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_Q = -\hbar\omega_0\hat{I}_z + \frac{e^2qQ}{4I(2I-1)}(3\hat{I}_z^2 - \hat{I}^2) \left[\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2}\sin^2\beta \cos 2\alpha \right] \quad (\text{II-23})$$

où α et β sont les angles d'Euler de la transformation de coordonnées permettant de passer du système d'axe du GCE à celui associé au référentiel du laboratoire. Le terme $eq = V_{ZZ}$ est le gradient de champ électrique au noyau. η est le paramètre d'asymétrie du GCE.

Comme nous l'avons mentionné pour le noyau phosphore, il est donc possible de déterminer les niveaux d'énergie associés à cet hamiltonien (Figure II-5). Il y a deux transitions (à un quantum) possibles entre les trois niveaux d'énergie déterminés ($I=1$). Ceci conduit à deux raies (doublet) de résonance sur le spectre, centrées sur la fréquence de Larmor. L'écart entre les deux raies est appelé l'éclatement quadrupolaire et correspond à :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2qQ}{\hbar} \left[\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2}\sin^2\beta \cos 2\alpha \right] \quad (\text{II-24})$$

Le terme $\frac{e^2qQ}{\hbar}$ représente la constante de couplage quadrupolaire statique et est généralement noté A_Q . Dans le cas des liaisons méthylènes carbone-deutérium $C-^2H$, que l'on retrouve sur les chaînes deutérées des lipides, $A_Q = 167$ kHz (Burnett et Muller, 1971). L'équation précédente se simplifie alors :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left[\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2}\sin^2\beta \cos 2\alpha \right] \quad (\text{II-25})$$

où l'angle β définit l'orientation des liaisons C-²H par rapport à l'axe z du référentiel du laboratoire, parallèle au champ magnétique \vec{B}_0 (il est important de mentionner que l'on considère l'axe z du GCE comme colinéaire aux liaisons C-²H) (Figure II-6).

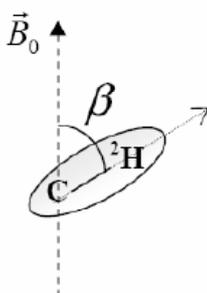


Figure II-6 Représentation de l'angle β traduisant l'angle entre le GCE et le champ magnétique (image extraite de Loudet, 2006). L'ovale gris représente le GCE.

❖ Les cristaux

Par analogie avec ce qui a été vu précédemment avec les noyaux phosphores pour des poudres de phospholipides, les liaisons C-²H sont orientées selon une distribution sphérique par rapport au champ magnétique. Les spectres RMN du deutérium correspondent donc à la superposition des raies de résonance associées à chaque orientation, pondérées par leur probabilité d'existence (Figure II-7e).

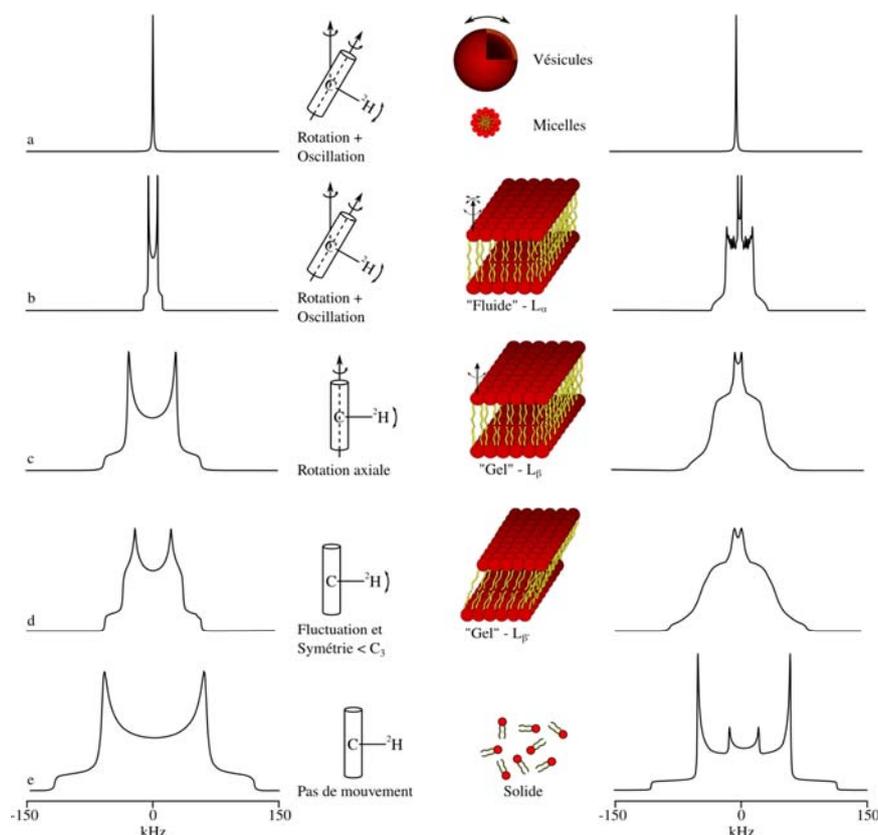


Figure II-7 Influence des mouvements moléculaires et de la phase considérée sur la forme des spectres RMN du deutérium (Buchoux, 2006, adaptée de Dufourc, 1986). A gauche : spectres simulés pour un seul noyau deutérium. A droite, spectres simulés pour un lipide de type DMPC-d54.

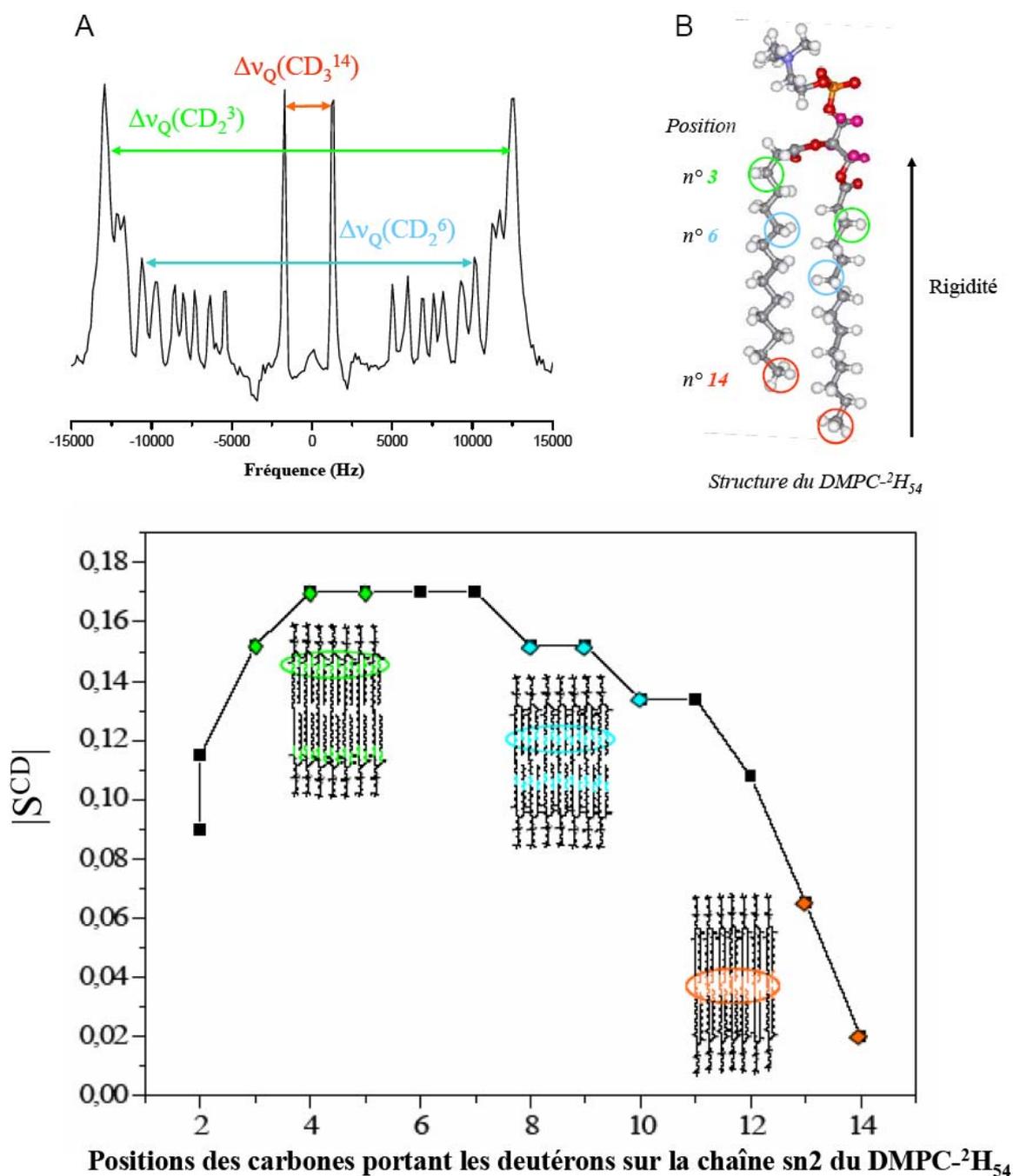


Figure II-8 Exemple d'un profil d'ordre de DMPC-d54 dans des bicelles (Loudet, 2006 adapté de Aussenac et al., 2003). A : Spectre RMN du deutérium du DMPC-d54 constitutif des bicelles DMPC/DDPC qui s'orientent telle que leur normale soit perpendiculaire à B_0 . B : Structure moléculaire du DMPC-d54. C : Etude du profil d'ordre présentant SCD en fonction de la position des carbones porteurs des atomes de deutérium sur la chaîne sn-2 du DMPC-d54 présent dans des bicelles de DMPC/DPPC.

❖ Les bicouches

Lorsque les lipides sont engagés dans une bicouche en phase fluide, ceux-ci tournent rapidement sur eux-mêmes induisant ainsi une symétrie axiale. De ce fait, le paramètre d'asymétrie η vaut zéro. L'équation de l'éclatement quadrupolaire (II-25) se simplifie alors :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2}A_Q \left[\frac{3\cos^2\beta-1}{2} \right] \quad (\text{II-26})$$

Suivant la phase de la bicouche (gel et fluide) ou la taille globale de l'objet (MLV, SUV ou micelles), la forme des spectres va être modulée. Plus la dynamique du système augmente, plus l'interaction quadrupolaire est moyennée. Ceci se traduit par une diminution des éclatements quadrupolaires (et donc une diminution de la largeur du spectre). Ceci est illustré par la figure II-7. Dans le cas de petites vésicules, dont les mouvements de réorientation sont considérés comme isotropes, une seule raie isotrope est observée sur le spectre RMN, à la fréquence de déplacement chimique isotrope des liaisons C-²H (Figure II-7a).

❖ Paramètre d'ordre

Afin de décrire l'amplitude des mouvements moléculaires membranaires, Saupe puis Seelig ont introduit la notion de paramètre d'ordre. Ce paramètre permet de quantifier l'état d'organisation d'un système (Seelig, 1977).

Dans le cas des bicouches de lipides, on définit θ_i , les trois angles permettant le passage des axes principaux du GCE aux axes principaux du lipide. Les fluctuations dans l'espace et dans le temps de la liaison C-²H par rapport à la normale à la bicouche peuvent être alors estimées par les paramètres d'ordre S_{ii} :

$$S_{ii} = \frac{3\langle\cos^2\theta_i\rangle-1}{2} \quad (\text{II-27})$$

où $i=x,y,z$ représente le système d'axes de la liaison C-²H. Le terme $\langle\cos^2\theta_i\rangle$ indique une moyenne dans le temps des fluctuations de θ_i par rapport à l'axe directeur du lipide, z' .

Grâce à la rotation du lipide sur lui-même, $S_{zz'}$ est suffisant pour rendre compte des fluctuations. En effet, nous avons :

$$S_{zz'} = -2S_{xx'} = -2S_{yy'} \quad (\text{II-28})$$

On peut ainsi exprimer l'éclatement quadrupolaire en fonction de ce paramètre d'ordre :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2}A_Q \left[\frac{3\cos^2\beta'-1}{2} \right] S_{zz'} \quad (\text{II-29})$$

où β' est l'angle entre l'axe directeur du lipide z' et le champ magnétique \vec{B}_0 . Dans le cas de la liaison C-²H, nous rappelons que l'axe principal de GCE est quasiment colinéaire avec

l'axe de la liaison. Par conséquent, S_{zz} peut être noté S_{CD} et rend compte des fluctuations de la liaison C-D (= C-²H). L'équation II-29 devient alors :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2}A_Q \left[\frac{3 \cos^2 \beta' - 1}{2} \right] S_{CD} \quad (\text{II-30})$$

On remarque que la mesure de l'éclatement quadrupolaire entre les pics les plus intenses (correspondant à l'orientation $\beta'=90^\circ$) donne une estimation directe du paramètre d'ordre S_{CD} :

$$\Delta\nu_Q(90^\circ) = \frac{3}{4}A_Q S_{CD} \quad (\text{II-31})$$

Dans une membrane lipidique, l'ordre des lipides évolue au fil de la chaîne lipidique. Il est donc souvent utile de tracer S_{CD} en fonction de la position du carbone porteur du ou des deutériums : c'est le profil d'ordre du lipide dans la membrane.

La figure II-8 illustre un tel profil d'ordre obtenu pour des bicelles de DMPC_{d54}/DCPC. Ces bicelles sont orientées de manière perpendiculaire au champ magnétique. Ceci implique que l'on obtient un spectre avec une orientation privilégiée et donc avec une meilleure résolution. Cette augmentation de la résolution permet de mesurer les éclatements quadrupolaires, correspondants aux différents groupes C-²H sur les chaînes du lipide. A partir des éclatements quadrupolaires mesurés, nous pouvons calculer (à partir de l'équation II-31) les paramètres d'ordre correspondant. On constate alors que plus on remonte sur la chaîne d'acide gras vers le squelette glycérol, plus l'éclatement quadrupolaire et donc le paramètre d'ordre est grand, ce qui est synonyme d'une rigidité du système plus grande. La position 2 sur la chaîne aliphatique présente deux valeurs de S_{CD} . Ceci est dû à la proximité du carbonyle et du glycérol qui rend les deutériums non équivalents. Nous constatons également que les S_{CD} obtenus pour les deutériums situés dans la région supérieure des chaînes sont relativement constants. On parle d'ailleurs couramment de la région « plateau ». Ceci provient de l'arrangement des têtes hydrophiles qui imposent des contraintes stériques et donc un mouvement restreint dans cette zone. Au-delà de la région « plateau », les S_{CD} diminuent. Le groupement méthyle terminal possède un S_{CD} plus faible que le reste de la chaîne en raison d'un degré de liberté supplémentaire (rotation autour de l'axe C₃). Nous verrons ultérieurement que pour obtenir des profils d'ordre à partir de spectre de poudre d'échantillons non orientés, une déconvolution est nécessaire.

Il est important de mentionner que la RMN du deutérium permet également une estimation de la vitesse des mouvements moléculaires cités précédemment. Ceci se fait en mesurant les temps de relaxation magnétiques nucléaires. Cependant, aucune mesure de ce

type n'a été effectuée au cours de ce travail. L'aspect théorique ne sera pas donc présenté dans cette thèse (cependant pour plus de détails, vous pouvez vous référer à Dufourc, 2006).

c) La RMN en rotation à l'angle magique

A partir d'échantillon solide, il est possible, sous certaines conditions bien spécifiques, d'obtenir des spectres RMN dont la résolution est équivalente à celle généralement obtenue en RMN des liquides. La technique consiste à faire tourner mécaniquement l'échantillon préalablement orienté à $54,7^\circ$ par rapport au champ externe. Nous avons vu précédemment que la plupart des interactions magnétiques anisotropes avaient une dépendance angulaire en $\left[\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2}\right]$ par rapport au champ magnétique statique. Il a été observé que ce terme s'annule pour $\beta = 54,7^\circ$. On parle alors couramment de l'angle magique. Ainsi, si la fréquence de rotation de l'échantillon est supérieure à la fréquence de l'interaction magnétique anisotrope considérée, il est possible de moyenniser cette dernière. L'effet Zeeman, le blindage électronique et le couplage indirect spin-spin sont donc les interactions à prendre compte. Nous nous rapprochons ainsi des conditions liquides.

Pour moyenniser l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique (pour la RMN du phosphore par exemple), il sera nécessaire de tourner au moins à des vitesses de l'ordre des 8 kHz. On aura alors accès aux valeurs de déplacement chimique isotrope des lipides présents dans l'échantillon. A ce jour, il est impossible de moyenniser l'interaction quadrupolaire (varie de 20 à 200 kHz). La vitesse maximale reportée est de 70 kHz pour un rotor de 0,5 mm.

II.2.3 La théorie de l'échange à deux sites

Au sein d'une même membrane, des domaines peuvent exister. Les lipides contenus dans chaque domaine peuvent alors s'échanger. La théorie de l'échange à deux sites, issu du processus Markoff, peut alors s'appliquer (Abragam, 1961). Considérons deux espèces A et B capables de s'échanger. Notons ω_A et ω_B les fréquences de résonance respectives de A et B, et k_A et k_B les probabilités par unité de temps pour que ces deux molécules échangent leur site (Figure II-9A). On distingue alors trois types d'échanges possibles suivant la valeur des constantes de vitesses k_A et k_B (Figure II-9B et C).

– Si $k_A, k_B \ll \omega_A - \omega_B$, on parle alors d'échange lent. Dans ce cas, le spectre RMN est constitué de deux raies de résonance bien distinctes (cas isotrope) ou de deux spectres de poudre distincts.

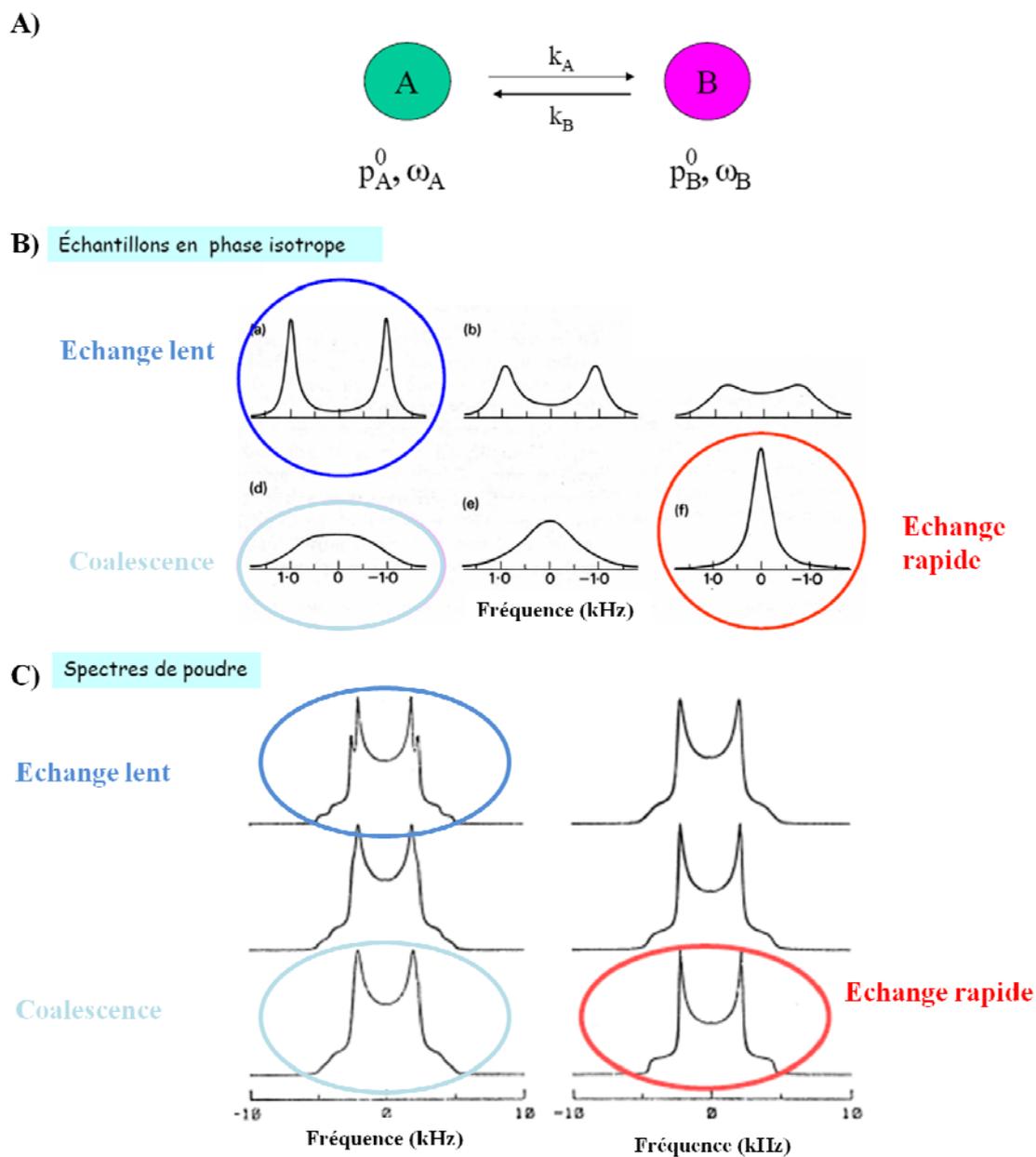


Figure II-9 Forme des spectres RMN en fonction de la vitesse de l'échange (Loudet, 2006). A : Description des espèces qui s'échangent. B : effet de l'échange en phase isotrope. C : effet de l'échange en phase anisotrope.

–Si $k_A, k_B \gg \omega_A - \omega_B$, l'échange est dit rapide à l'échelle de la RMN. Dans ce cas, le spectre RMN est constitué d'une seule raie de résonance ou un seul spectre de poudre.

–Lorsqu'aucune des deux inégalités précédentes n'est vérifiée, les échanges sont dits dans le régime des vitesses intermédiaires. On distingue cependant l'étape de coalescence pour laquelle $k_A, k_B \approx \omega_A - \omega_B$, pour laquelle les spectres présentent un élargissement important (diminution de l'intensité des raies).

II.2.4 Description générale d'une expérience de RMN

Afin d'avoir accès aux transitions entre les différents niveaux d'énergie, la spectroscopie de RMN repose sur trois étapes essentielles. Dans un premier temps, le système est à l'équilibre. On va ensuite perturber le système de manière à ce qu'il y ait transition entre les différents niveaux d'énergie. Après arrêt de la source de perturbation, le système va relaxer afin de retourner à son état d'équilibre et c'est ce que nous détecterons.

Afin de présenter ces différentes étapes, un exemple d'une expérience RMN simple, dans laquelle le système n'est soumis à aucune autre interaction que celle de Zeeman, est présenté. Nous présenterons ensuite une description des expériences RMN pour les noyaux phosphore et deutérium lorsque ceux-ci se trouvent au sein d'une membrane.

a) Cas simple : seule l'interaction de Zeeman est présente

❖ Equilibre

Nous avons précédemment vu qu'un spin non nul placé dans un champ magnétique précesse autour de l'axe z (colinéaire à \vec{B}_0) à la fréquence de Larmor $\nu_0 = \gamma B_0$ (Figure II-1). La répartition des spins sur les différents niveaux d'énergie ($2I+1$ niveaux) obéit à la distribution statistique de Boltzmann. On a alors \vec{M}_0 , l'aimantation résultante de l'alignement des spins suivant \vec{B}_0 .

❖ Perturbation

En RMN, l'énergie nécessaire à la transition entre les niveaux énergétiques (transitions observées pour $\Delta E = h\nu$) est apportée par un champ radiofréquence B_1 . Celui-ci est produit à l'aide d'une bobine (solénoïde) traversée par un courant électrique. La fréquence de ce champ oscillant doit être la même que la fréquence de précession du noyau. De cette manière, il se crée un phénomène de résonance entre les deux oscillateurs et ceci permet un transfert d'énergie entre la bobine excitatrice et le système.

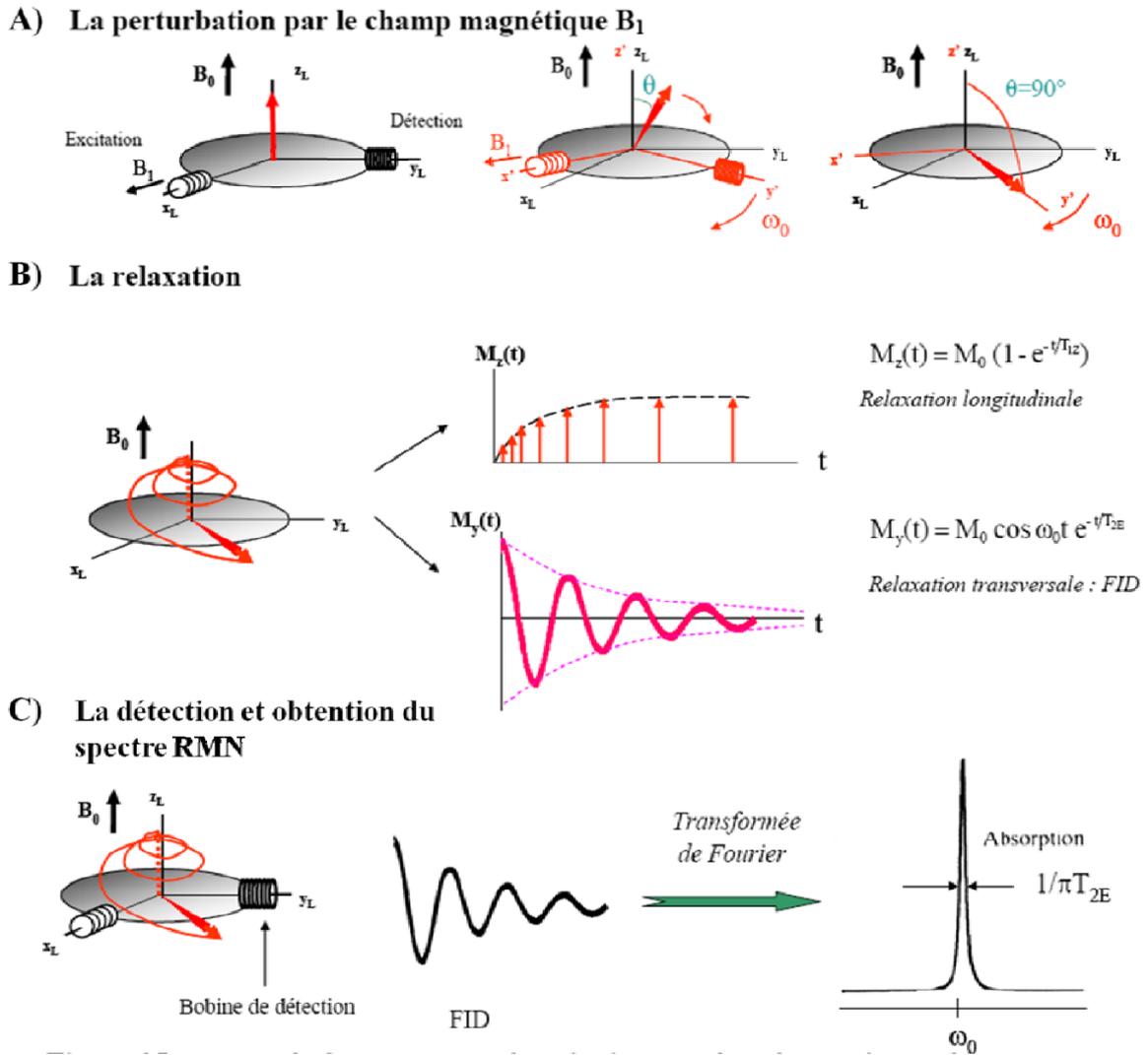


Figure II-10 Représentation des étapes de perturbation et de relaxation du système lors d'une expérience RMN (Loudet, 2006). x_L, y_L, z_L représente le référentiel du laboratoire. $x', y',$ et z' représente le référentiel tournant.

Du fait de cet apport énergétique, la population des différents niveaux d'énergie est perturbée et l'orientation de l'aimantation résultante \vec{M}_0 change. A cause de la précession de Larmor, il est nécessaire de définir un référentiel tournant (x', y', z') dont l'axe z' est parallèle à l'axe z_L du référentiel du laboratoire (x_L, y_L, z_L). Le champ \vec{B}_1 opère dans ce référentiel et plus précisément le long de l'axe x' (Figure II-10A). L'aimantation résultante, initialement orientée suivant z' , basculera d'un angle θ en direction de l'axe y' :

$$\theta = \gamma B_1 \tau \quad (\text{II-32})$$

où τ est le temps pendant lequel on applique le champ oscillant B_1 .

❖ *Relaxation et détection*

En règle générale, la détection de l'aimantation résultante se fait le long de l'axe y_L (ou du moins dans le plan (x_L, y_L)). Le temps d'application du champ B_1 , τ , est donc calculé de façon à ce que θ soit égale à 90° . Ainsi, lorsque l'application de champ B_1 cesse, l'aimantation est orientée suivant y' , situé dans le plan (x_L, y_L) (Figure II-10A). Le système retourne progressivement vers son état d'énergie initial, soit \vec{M}_0 colinéaire à \vec{B}_0 . Ce retour à l'équilibre se décompose en une relaxation longitudinale selon l'axe z_L et en une relaxation transversale selon le plan (x_L, y_L). Le suivi du retour de l'aimantation le long de l'axe z_L (étude de la relaxation longitudinale) se traduit par une exponentielle croissante de la forme (Figure II-10B) :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_{1z}}}) \quad (\text{II-33})$$

T_{1z} est le temps de relaxation longitudinale. Ce temps est lié aux échanges thermiques d'énergie entre les spins et le bain thermique du système (réseau) via les mouvements moléculaires. On parle alors de relaxation spin-réseau. Son étude donne des informations sur les mouvements moléculaires à l'échelle de la nanoseconde.

Dans le plan (x_L, y_L), la perte de l'aimantation (étude de la relaxation transversale) se fait aussi de manière exponentielle. Cependant, elle est modulée par la précession de Larmor. Le signal détecté se traduit alors par une cosinusoïde multipliée par une exponentielle décroissante (Figure II-10B) :

$$M_y(t) = M_0 \cos(\omega_0 t) e^{-\frac{t}{T_{2E}}} \quad (\text{II-34})$$

T_{2E} traduit le temps de relaxation transversale. Ce temps est lié aux interactions entre les spins du système via les mouvements moléculaires et caractérise la relaxation spin-spin. Son étude donne des informations sur la dynamique lente des molécules ou de leurs assemblages à

l'échelle de la microseconde ou de la seconde. C'est le phénomène de relaxation transversale qui constitue le signal de précession libre des spins ou FID (« Free Induction Decay »). La FID obtenue est ensuite numérisée à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique puis traitée informatiquement afin de pouvoir être interprétée. Ce traitement se fait au moyen d'un outil mathématique, la transformée de Fourier. Ceci permet le passage du domaine temporel (la FID), difficilement interprétable, au domaine fréquentiel (le spectre RMN), plus adapté (Figure II-10C). Le spectre est composé de raies dont la position en fréquence rend compte des couplages internes des noyaux et dont la largeur est associée à la dynamique et à l'orientation des molécules.

b) Expérience de RMN des solides

Comme cela a déjà été évoqué, les interactions solides, en particulier l'interaction quadrupolaire, ont une signature spectrale très large. Dans le cas du deutérium par exemple, celle-ci est de l'ordre de la centaine de kHz. Il est nécessaire que la fenêtre d'excitation soit au minimum de la taille de l'interaction la plus large. En première approximation, la fenêtre d'excitation, correspondant à la transformée de Fourier du champ radiofréquence d'excitation, est de l'ordre de $2/t$ (t étant le temps d'application du champ radiofréquence). Ainsi, plus t est petit, plus la couverture spectrale sera importante. Généralement, t_{90° vaut quelques microsecondes en RMN des solides. Pour obtenir malgré tout un basculement des spins de 90° dans un échantillon solide en un temps aussi bref, il est nécessaire d'utiliser des puissances importantes (plusieurs centaines de W) pour générer le champ de radiofréquence. Cependant, ces hautes puissances induisent, après l'impulsion radiofréquence, un temps mort machine de quelques microsecondes. Pendant ce temps mort, il est impossible de faire une acquisition. Ceci pose un problème majeur en RMN des solides. En effet, dans ce cas, les temps de relaxation peuvent être très courts, ce qui signifie que le système peut retourner à son état d'équilibre pendant le temps machine. Il y a donc perte d'information.

Pour s'affranchir de ces pertes d'informations, des séquences d'impulsions d'écho ont été développées (Hahn, 1950). Elles sont basées sur une refocalisation des interactions. Le principe est le suivant : une première impulsion d'excitation fait basculer les spins de 90° , après un temps τ , une deuxième impulsion est appliquée au système dans le but de refocaliser l'interaction à étudier. Cette refocalisation ne se fait pas immédiatement après la deuxième impulsion mais après un temps égal à τ . Ceci implique que le maximum des cosinusoïdes constitutives du signal est décalé d'un temps égal à τ par rapport à la dernière impulsion. L'acquisition peut ainsi être décalée de la même façon sans perte d'information.

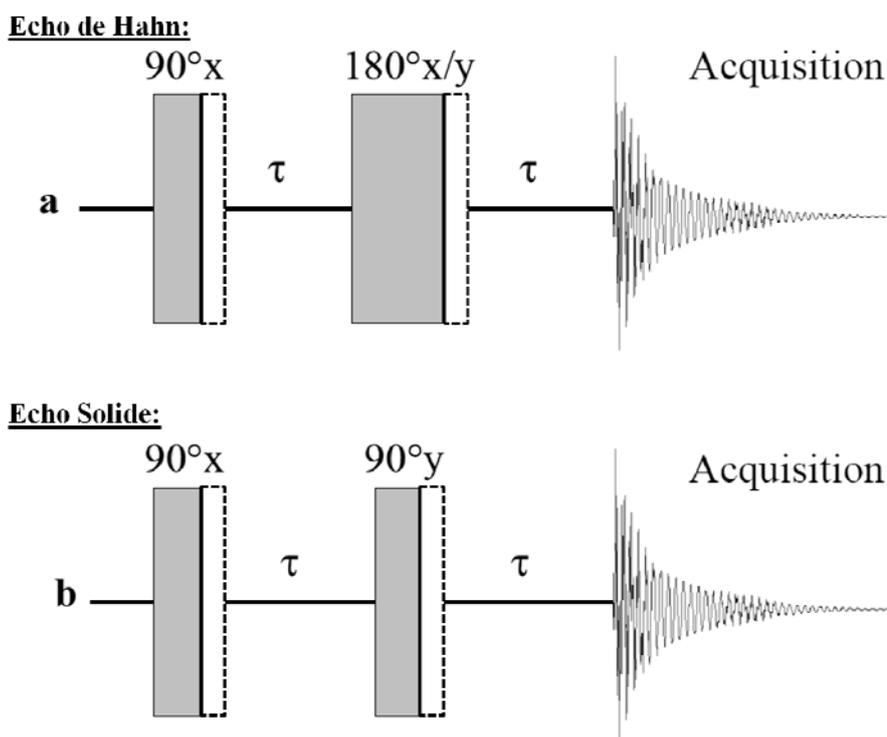


Figure II-11 Séquence d'impulsions d'écho : a) Echo de Hahn et b) Echo Solide. Les cadres en pointillés représentent le temps mort machine (pour plus de détails voir texte).

Le délai τ doit être plus grand que la durée du temps mort mais suffisamment court pour éviter de perdre en signal sous l'effet de la relaxation.

Dans le cas des noyaux de spin $I=1/2$ tels que le phosphore, la séquence d'écho de Hahn est utilisée pour refocaliser les interactions de déplacement chimique et spin-spin indirecte (Figure II-11a) (Rance et Byrd, 1983). Cette séquence ne permet pas de refocaliser les interactions quadrupolaire et dipolaire. Une séquence a donc été développée, que l'on nomme la séquence d'écho quadrupolaire ou encore séquence d'écho solide (Figure II-11b). Dans, ce cas la deuxième impulsion est de 90° . Dans le cadre de notre étude par RMN du deutérium sur des modèles membranaires, nous avons utilisé cette séquence (Davis et al., 1976).

Au cours de ce travail, les expériences RMN de phosphore ont été réalisées sur des spectromètres Bruker Avance Biospin 400 (sonde QNP- « Quadruple Nuclei Probe »), 500 (Sonde CP-MAS : « Cross Polarization-Magic Angle Spinning ») ou 700 MHz (Sonde CP-MAS efree). Les expériences RMN du deutérium ont été réalisées sur des spectromètres Bruker Avance Biospin 500 (Sonde CP-MAS bas γ et PE Triple) and 700 MHz (Sonde CP-MAS efree). Les logiciels associés aux spectromètres sont de type BRUKER TopSpin version 2.1.

II.2.5 Traitement des données

Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID est convoluée par une exponentielle décroissante de type e^{-LBt} (opération de filtrage). Le terme LB (« Line Broadening »), exprimé en hertz (Hz), peut varier de quelques Hz en RMN des liquides à plusieurs centaines d'Hz en RMN des Solides. Cette différence s'explique par le fait qu'en RMN des solides, la FID s'amortit très rapidement et donc seuls les premiers points de la FID correspondent au signal.

a) Mesure de l'anisotropie de déplacement chimique

A partir des spectres RMN du phosphore, nous pouvons déterminer l'anisotropie de déplacement chimique, $\Delta\sigma$. Ce paramètre nous apporte des informations sur la dynamique et/ou l'orientation des phosphores dans la membrane. Nous avons vu précédemment que ce paramètre pouvait être mesuré directement sur les spectres grâce à la relation :

$$\Delta\sigma = \Delta\nu(90^\circ) - \Delta\nu(0^\circ) = \Delta\nu_{\perp} - \Delta\nu_{\parallel}$$

Cependant, cela n'est pas toujours possible si les raies sont mal résolues (en particulier la raie correspondant à l'orientation parallèle) ou en présence d'un mélange de lipides dont les raies se superposent. Nous pouvons donc seulement utiliser la raie de résonance correspondant à l'orientation perpendiculaire qui est plus intense et donc généralement bien résolue. Cette fréquence de résonance est reliée à $\Delta\sigma$ par :

$$\Delta\nu(90^\circ) = \nu(90^\circ) - \nu_{iso} = \frac{1}{3} \Delta\sigma \quad (\text{II-35})$$

Afin de valider nos attributions des anisotropies de déplacement chimique (notamment pour les spectres RMN des phosphoinositides), nous avons eu également recours à la simulation de spectre RMN du phosphore. Pour cela, nous avons utilisé un programme codé en FORTRAN dans lequel nous avons introduit les données telles que les anisotropies de déplacement chimique (estimées à partir des spectres expérimentaux), les largeurs de raies, le déplacement chimique isotrope, et le poids moléculaire des espèces considérées. Ce programme calcule ensuite la FID correspondante et effectue sa transformée de Fourier (Dufourc, non publié). Par comparaison entre spectres expérimentaux et spectres simulés, nous pouvons alors valider ou affiner nos différentes prédictions. Dans certains cas, il a été nécessaire d'introduire un paramètre c/a tenant compte de la déformation des MLV par le champ magnétique (c et a correspondent aux axes d'une ellipsoïde) (Pott et al. 1995).

b) Calcul du moment d'ordre 1

Nous avons vu précédemment que l'ordre local de la membrane peut être déterminé grâce à la relation entre le paramètre d'ordre S_{CD} et l'éclatement quadrupolaire $\Delta\nu_Q$.

Cependant, il est difficile de mesurer directement les éclatements quadrupolaires individuels sur les spectres de poudre d'échantillons non orientés. En effet, la dépendance orientationnelle en fréquence par rapport au champ magnétique ainsi que le recouvrement des signaux entraînent des largeurs de spectres importantes. Davis et Bloom ont développé des méthodes permettant d'analyser la dynamique de ces systèmes non orientés.

Un moment est une grandeur spectrale calculée à partir de l'intensité du spectre $f(\omega)$ par rapport à une fréquence de référence ω_0 (fréquence de Larmor en RMN des solides). Les moments d'ordre n d'un spectre de poudre s'expriment selon Davis par (Davis, 1979):

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{\infty} f(\omega) d\omega} \quad (\text{II-36})$$

Il apparaît alors que dans le cas des spectres symétriques obtenus en RMN du deutérium, les moments d'ordre impair seront nuls. Dans ce cas, les moments ont été redéfinis de la manière suivante :

$$M_n = \frac{\int_0^{\infty} (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega}{\int_0^{\infty} f(\omega) d\omega} = \frac{1}{A} \int_0^{\infty} (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega \quad (\text{II-37})$$

Dans le cas des bicouches, du fait de la symétrie axiale, les moments peuvent être reliés à la distribution des éclatements quadrupolaires (moyennée sur l'ensemble des mouvements) par la relation :

$$M_n = A_n (2\pi)^n \langle (\Delta\nu_Q)^n \rangle \quad (\text{II-38})$$

A_n est une constante dépendante de n et donne ainsi :

$$M_1 = \frac{4\pi}{3\sqrt{3}} \langle \Delta\nu_Q \rangle \quad (\text{II-39})$$

Le moment M_1 d'une chaîne deutérée est relié à la mesure globale du paramètre d'ordre $\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ (en combinant avec l'équation II-30). Cette relation est donnée par:

$$M_1 = \frac{\pi}{\sqrt{3}} A_Q \langle S_{CD} \rangle_{chaîne} \quad (\text{II-40})$$

A_Q étant la constante quadrupolaire.

Le calcul du premier moment en RMN du deutérium permet donc de suivre la dynamique globale d'une chaîne deutérée. Le moment M_1 est calculé en utilisant un programme développé au laboratoire, codé en C++ (Buchoux S., non publié) dans lequel les données RMN sont exportées.

c) La déconvolution spectrale appelée également « De-Pake-ing »

Comme nous l'avons déjà mentionné, il est difficile de mesurer directement les éclatements quadrupolaires individuels sur les spectres de poudre d'échantillons non orientés, en raison de la dépendance orientationnelle en fréquence par rapport au champ magnétique et du recouvrement des signaux, qui entraînent des largeurs de spectres importantes. Partant de la dépendance orientationnelle en $\left[\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2}\right]$ des systèmes à symétrie axiale, Blomm et ses collaborateurs ont montré qu'il était possible de construire un spectre orienté (par exemple à 90°) à partir du spectre de poudre (Bloom et al., 1981, Sternin et al., 1983). Grâce à cette méthode, il est ainsi possible d'extraire les éclatements quadrupolaires des différentes positions de la chaîne deutérée et remonter ainsi à leur dynamique propre (grâce à la relation reliant les éclatements quadrupolaires aux paramètres d'ordre) (Figure II-12). Cette méthode est donc complémentaire du calcul des moments qui nous donne seulement une information de dynamique globale de la membrane.

Dans certains cas, la résolution de nos spectres n'a pas permis de faire une déconvolution spectrale. Pour estimer cependant les paramètres d'ordre, nous avons directement mesuré sur les spectres les éclatements quadrupolaires de la région plateau (extrémités du spectre) et des méthyles terminaux à 90° (raies les plus intenses).

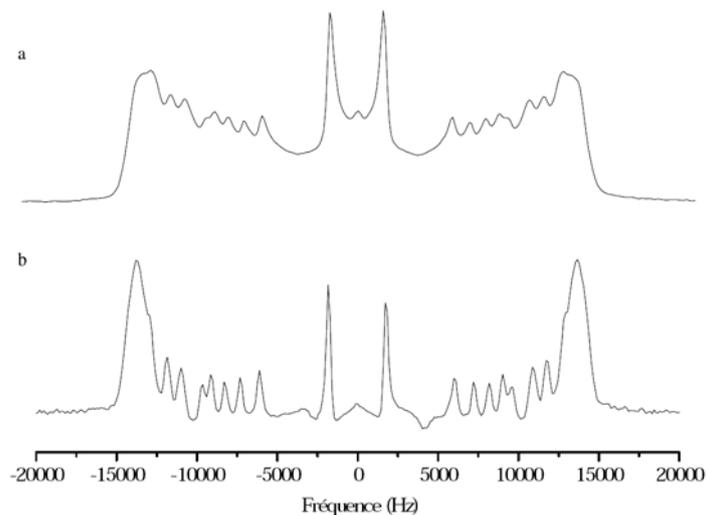


Figure II-12 Illustration de la technique de déconvolution (Loudet, 2006). a) Spectre RMN du deutérium de liposomes MLV de DMPC-d54. b) spectre précédent déconvolué (échantillon orienté à 90° par rapport à B_0).

d) Calcul du pourcentage de raie isotrope

Dans certains cas, les spectres obtenus pour nos systèmes sont composés d'une raie fine isotrope et d'un spectre de poudre anisotrope. Le pourcentage d'isotropie peut-être déterminé en utilisant deux méthodes différentes, la méthode de Fenske et al. (Fenske et al., 1994) et la méthode par simulation de raie isotrope.

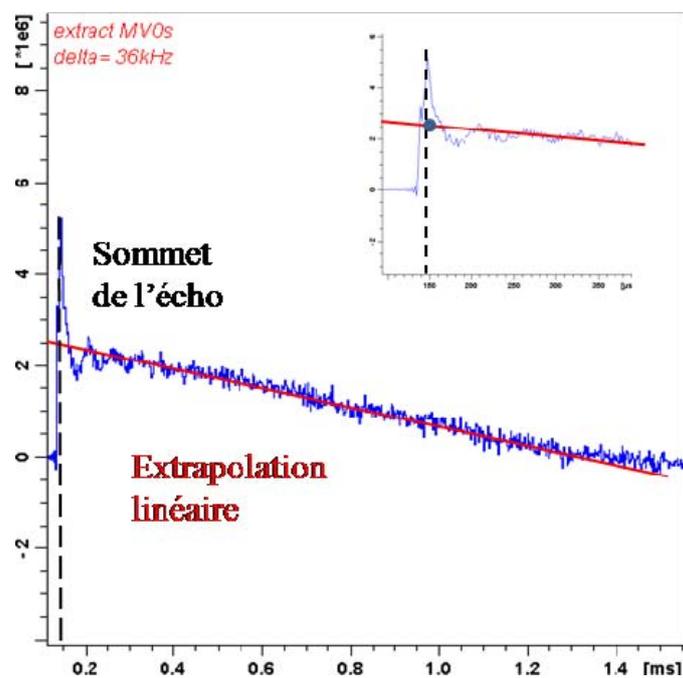


Figure II-13 Méthode de Fenske et al. pour la détermination du pourcentage d'isotropie à partir de la FID. a: Exemple d'extrapolation linéaire manuelle de la courbe à décroissance lente.

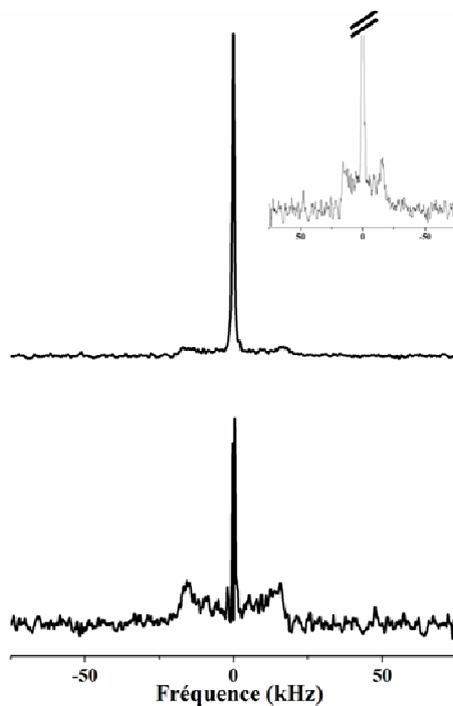


Figure II-14 Méthode de simulation de la raie isotrope pour la détermination du pourcentage d'isotropie. En haut est représenté un spectre dont la composante est très importante (zoom vertical dans l'encadré). En bas, le même spectre dont la composante isotrope a été retiré par soustraction avec une raie isotrope simulée.

La méthode de Fenske et al. est basée sur le fait que la FID du signal se compose de deux courbes décroissantes, une courbe d'écho à décroissance rapide (contribution solide) suivi d'une courbe à décroissance lente (contribution isotrope). Afin de déterminer le pourcentage d'isotropie, une extrapolation linéaire manuelle de la courbe à décroissance lente est réalisée jusqu'au temps correspondant au sommet de l'écho (Figure II-13). L'intensité de la courbe d'extrapolation, au niveau du pic de l'écho, est proportionnelle à la phase isotrope tandis que l'intensité mesurée au sommet de l'écho est proportionnelle à la quantité totale de lipides (Fenske et al., 1994).

Le principe de la méthode de soustraction de raie isotrope est basé sur la simulation d'une raie isotrope en utilisant l'outil NMRsim du logiciel TopSpin 2.1 (Bruker). Cette raie isotrope est ensuite soustraite au spectre deutérium expérimental (Figure II-14). Ensuite, nous intégrons le spectre expérimental (total) et le spectre dont la raie isotrope a été soustraite. Ceci nous permet de calculer le pourcentage de raie isotrope. La difficulté de cette méthode réside dans la construction d'une raie isotrope dont la largeur recouvre parfaitement la raie isotrope à soustraire. Cette opération est réalisée en faisant varier les valeurs de la largeur à mi-hauteur ce qui revient à jouer sur le LB du pic isotrope simulé.

II.3 La cryomicroscopie électronique

Au cours de ce travail, nous avons également eu recours à la cryomicroscopie électronique. Cette méthode nous a permis d'obtenir des clichés de nos objets et donc de visualiser nos lipides en dispersion. Ce travail s'est fait par collaboration avec une autre équipe de l'unité mixte de recherche CBMN (Chimie Biologie des membranes et des nanoobjets) : équipe Architecture des assemblages membranaires et processus cellulaires, dirigée par O. Lambert.

II.3.1 Historique

Les principes fondamentaux de la microscopie électronique ressemblent à ceux de la microscopie photonique. La différence principale réside dans le fait que des lentilles électromagnétiques, au contraire des lentilles optiques, concentrent un faisceau d'électrons émis à grande vitesse au lieu de la lumière visible.

La résolution maximum qu'il est possible d'obtenir avec un microscope optique dépend de la longueur d'onde des photons et de l'ouverture numérique du système optique. La limite de résolution transverse d d'un microscope, c'est-à-dire la plus petite distance en dessous de

laquelle deux points voisins ne seront plus distingués, peut être exprimée à l'aide de la longueur d'onde du faisceau incident λ , de l'indice de réfraction du milieu n , et de l'ouverture angulaire de la lentille α . La relation est définie par :

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (\text{II-41})$$

Au début du XX^e siècle, l'idée est venue de repousser la faible limite de résolution imposée par la longueur d'onde relativement élevée de la lumière visible (de 400 à 700 nanomètres) en mettant en jeu des électrons dont on savait, d'après la mécanique ondulatoire de Louis de Broglie, qu'ils possédaient à la fois les propriétés des particules et celles des ondes. Cela suggérait que l'on pouvait traiter un faisceau d'électrons de la même manière qu'un faisceau d'ondes électromagnétiques afin d'obtenir une image de l'échantillon. La relation de De Broglie attribue une longueur d'onde λ à un électron de masse m et de vitesse v , soit $\lambda=h/mv$ (h : constante de Planck), acquise en l'accélérant sous une différence de potentiel. Par exemple, des électrons accélérés dans le vide à une tension $V =100$ kV possèdent une longueur d'onde de 0,0037 nm. On constate alors que la longueur d'onde des électrons est beaucoup plus faible que celle d'un photon de la lumière du visible. D'après la relation II-41, on a alors une augmentation significative de la résolution. Les microscopes électroniques ont un plus grand pouvoir de résolution que les microscopes optiques.

II.3.2 Fonctionnement général de la microscopie électronique à transmission

Les électrons sont fournis par un canon à électrons (Figure II-15). Celui-ci est composé d'une source d'électrons ainsi que d'un système d'accélération. L'accélération des électrons se fait par l'établissement d'une tension élevée (le plus souvent de 100 à 300 kV) entre la cathode, qui est la source d'électrons, et l'anode. L'anode est une plaque qui est percée afin de permettre le passage des électrons.

Le faisceau d'électrons émergent du canon est ensuite focalisé sur l'échantillon par le biais d'un jeu de lentilles magnétiques (Figure II-15). Une lentille magnétique consiste en une bobine parcourue par un courant. Le mouvement des électrons dans les lentilles est alors régi par la force de Lorentz. Cet ensemble de lentilles présente l'avantage de pouvoir changer la focalisation simplement en changeant le courant passant dans les bobines. Malgré ces différences avec les lentilles optiques, les lois de l'optique géométrique peuvent être appliquées. La colonne contenant les lentilles et l'échantillon doit être sous-vide pour obtenir une image nette.

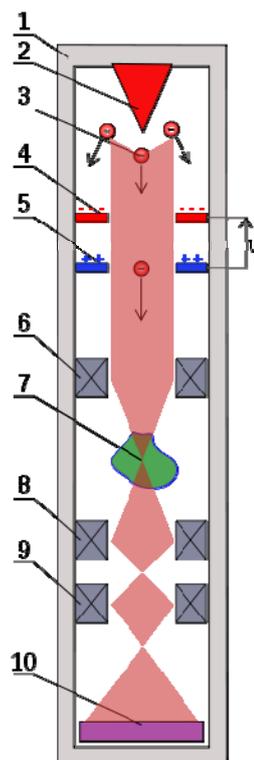


Figure II-15 Schéma du faisceau d'électrons dans un microscope électronique à transmission. 1 : colonne, 2 : source d'électrons, 3 : électrons, 4 : cathode, 5 : anode, 6 : lentilles condenseur, 7 : échantillon, 8 : lentilles de diffraction, 9 : lentilles projection, 10 : détecteur.

Ceci empêche une déviation des électrons par collision avec des molécules d'air. Le faisceau d'électrons transmis à travers l'échantillon est ensuite pris en charge par une (ou plusieurs) lentilles objectifs qui forme la première image agrandie de la zone de l'échantillon illuminée. La qualité des images obtenues dépend en grande partie de la qualité de ce jeu de lentilles.

Ensuite, des lentilles projecteurs permettent d'obtenir un agrandissement supplémentaire de l'image et projettent l'image finale sur un détecteur. Ce dernier peut être un écran fluorescent sensible aux électrons, un film photographique ou encore une caméra.

II.3.3 Formation de l'image

L'image finale est composée de niveaux de gris. Le contraste de l'image (variations de niveaux de gris au sein de l'image) dépend des différences de diffusion des électrons en différents points de l'échantillon. L'angle de déviation d'un électron diffusé dépend du numéro atomique de l'atome diffuseur. C'est la raison pour laquelle on contraste souvent les échantillons biologiques, dont les numéros atomiques des éléments qui les composent (C, N, O, H) sont faibles, à l'aide de métaux lourds. Ainsi, une zone de l'échantillon diffusant fortement les électrons se traduira sur l'image finale par une zone sombre. La présence d'un

diaphragme dans le plan focal image de la lentille objectif permet d'éliminer les électrons fortement déviés et donc d'augmenter le contraste de l'image (Figure II-16). On appelle ce contraste le contraste d'amplitude. Dans la pratique, la contribution du contraste d'amplitude est faible pour les échantillons congelés hydratés. Leur observation nécessite donc de sous focaliser l'échantillon afin de créer du contraste de phase.

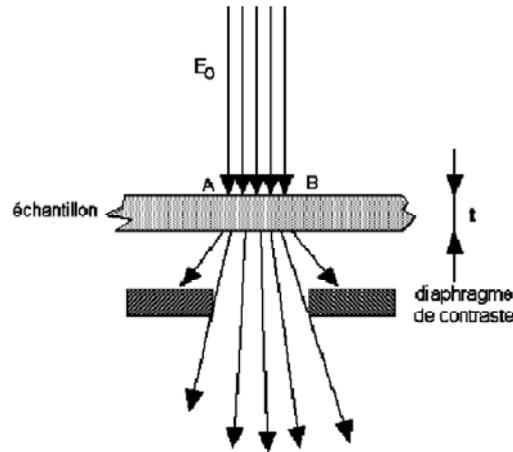


Figure II-16 Schéma explicatif du contraste d'amplitude engendré par la présence d'un diaphragme juste après l'échantillon. (pour le détail voir le texte).

II.3.4 Préparation d'échantillons pour la microscopie électronique à transmission

a) Principe

Les conditions d'observation en microscopie électronique à transmission imposent certaines contraintes quand à la nature des échantillons pouvant être analysés. La première contrainte est la nécessité d'observer des échantillons peu épais afin d'éviter les phénomènes de diffraction multiples au sein même de l'échantillon. Une deuxième contrainte est liée au vide poussé régnant dans la colonne du microscope qui impose d'observer des échantillons dépourvus d'eau sous forme liquide. Cette deuxième contrainte est particulièrement gênante dans le cadre d'échantillons biologiques fortement hydratés par nature.

La technique de cryomicroscopie électronique permet de contrecarrer ce problème. Elle consiste à observer un échantillon à une température très basse, en utilisant un porte-objet « cryo », qui permet de maintenir l'échantillon à une température très basse, proche de celle de l'azote liquide (-196°C). L'échantillon est congelé dans de l'éthane liquide (-190°C), couramment utilisé car il est un bien meilleur fluide cryogénique que l'azote liquide (Brugeller et Mayer, 1980 ; Dubochet et McDowall, 1981). L'échantillon est à l'état congelé-hydraté. La cryomicroscopie permet donc d'étudier les échantillons biologiques non marqués

et hydratés. En effet, la température très basse empêche l'eau de s'évaporer, même sous vide, ce qui permet d'observer l'échantillon en détail dans son état natif hydraté. C'est la technique que nous utiliserons dans le cadre de ce travail.

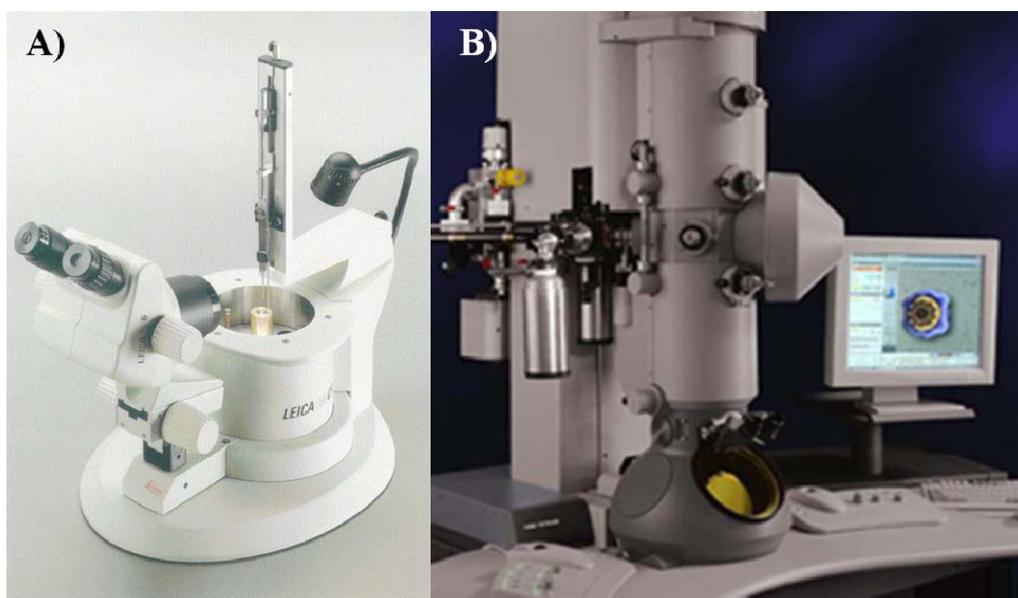


Figure II-17 Matériel utilisé pour la cryomicroscopie électronique. A) Guillotine pour la congélation des grilles (EM CPC, Leica). B) Microscope électronique en transmission (Tecnai FEG F20, FEI).

b) Protocole expérimental

Une goutte de l'échantillon en solution (dispersion de lipides précédemment décrite diluée à 1 mM) est déposée sur une grille de microscopie en cuivre recouverte d'un film de carbone à trous (Lacey/Formvar/Carbon, Ted Pella). Cette grille est préalablement rendue hydrophile par un traitement à l'UV-ozone. La méthode de congélation se fait par la technique de la « guillotine ». La grille est maintenue par une pince fixée au bras de la « guillotine » (EM CPC, Leica) (Figure II-17). L'excès de solution est éliminé par absorption à l'aide d'un papier filtre. De ce fait, seul un mince film de solution subsiste, suspendu dans les trous du carbone. La grille est ensuite rapidement plongée dans l'éthane liquide à -173°C , transformant l'eau liquide en glace amorphe. La grille est disposée dans un porte-grille préalablement refroidi et maintenu dans les vapeurs d'azote. La grille est ensuite montée sur un porte objet cryo (Gatan 626) à l'aide de sa station de transfert qui permet de maintenir la grille ainsi que l'extrémité du porte objet à température de l'azote liquide pendant toute l'opération de chargement de la grille. L'observation des échantillons est réalisée sur un microscope électronique en transmission Tecnai-F20 opérant à 200 kV et doté d'une source à émission de champ (FEG). Les images sont acquises en mode low-dose à un grandissement maximal de 50000x avec une caméra CCD 2k x 2k pixels (Gatan, CA, USA).

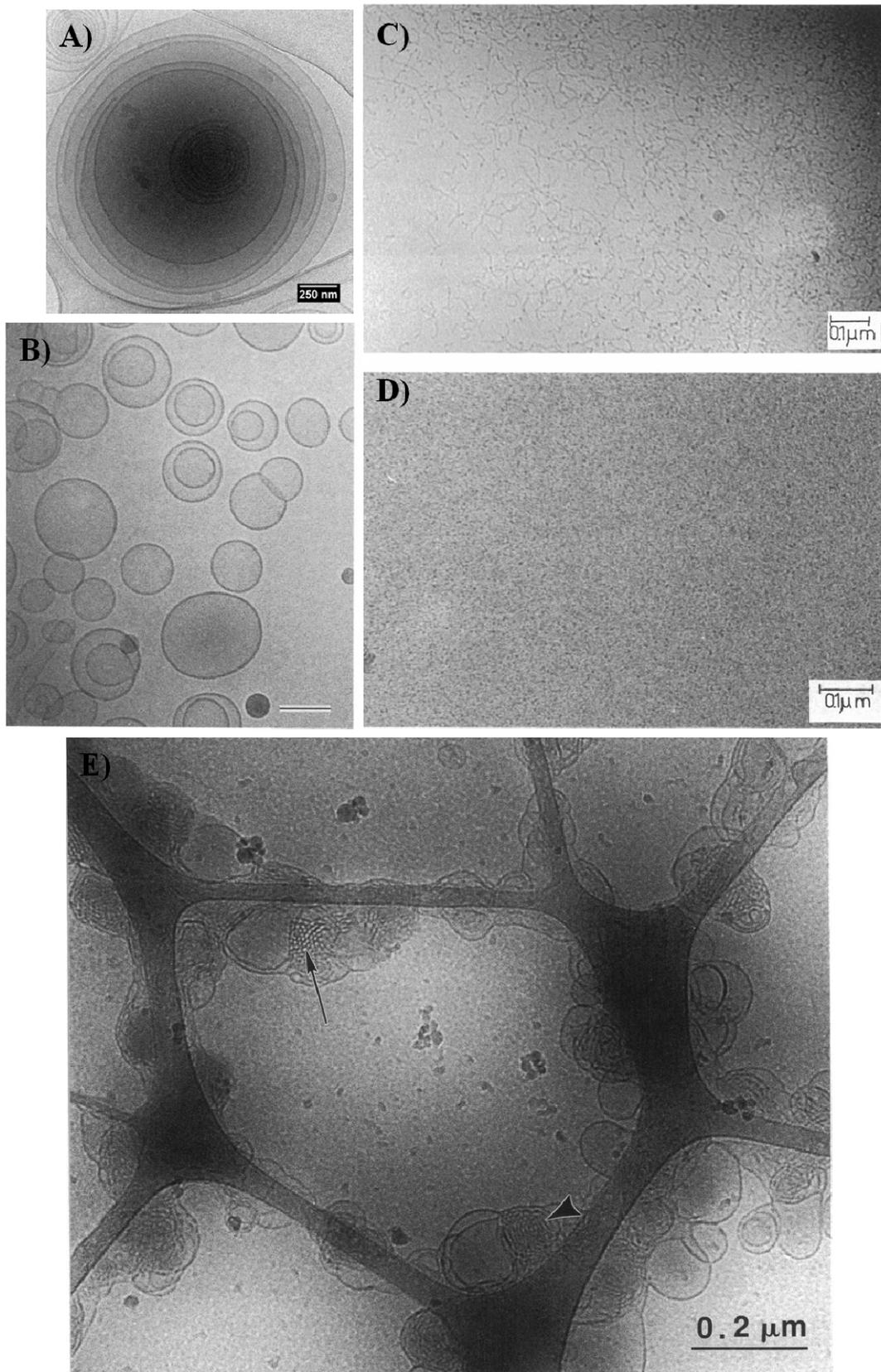


Figure II-18 Exemples de clichés obtenus par cryomicroscopie électronique pour différents agrégats lipidiques (adapté de Walter et al., 1991 ; Basáñez et al., 1997 ; Siegel et Epanand, 1997). A) Dispersion aqueuse de lipides formant des vésicules multilamellaires de l'ordre de 1 μm (Dispersion aqueuse de PI). B) Mélange de vésicules unilamellaires et multilamellaires de l'ordre de 100 nm (Dispersion aqueuse de PE extrudée à 100 nm, Barre d'échelle de 100 nm). C) Micelles cylindriques (tubulaires) et micelles sphériques (Dispersion aqueuse d'un mélange de PC et de surfactants). D) Micelles sphériques. E) Transition entre une phase lamellaire constituée de LUVs et une phase hexagonale. Flèche : vue transversale de la phase hexagonale, tête de flèche : vue longitudinale d'une phase hexagonale (Dispersion aqueuse d'un mélange de PC et de surfactants).

c) Exemples de micrographies de dispersions aqueuses de lipides

La figure II-18 montre quelques exemples de clichés obtenus par cryomicroscopie électronique que nous pouvons retrouver pour des dispersions aqueuses de lipides.

Les images A et B montrent des vésicules multilamellaires et unilamellaires. Chaque anneau sombre correspond à une bicouche lipidique. Sur le cliché A, nous observons la structure classique de type « oignon » des vésicules multilamellaires, soit plusieurs bicouches lipidiques concentriques. Sur l'image B, nous constatons des vésicules unilamellaires de l'ordre de 100-200 nm ainsi que des vésicules bilamellaires (deux bicouches concentriques).

Le cliché C montre un mélange de micelles cylindriques et de micelles sphériques obtenus dans le cas d'un mélange de PC et de surfactant (Walter et al., 1991). Les micelles cylindriques sont caractérisées par de longues lignes tortueuses et de faible épaisseur (de l'ordre de 5 nm). Les points noirs que nous apercevons peuvent être associés à des micelles sphériques mais aussi à des embranchements de micelles cylindriques.

L'image D montre une solution composée essentiellement de micelles sphériques (Walter et al., 1991), caractérisées par les nombreux points noirs. Dans ce cas, nous sommes à la limite de résolution.

Le micrographe E représente une dispersion de LUVs de PE subissant une transition vers une phase hexagonale sous l'influence du pH (Siegel et Eppard, 1997). Nous constatons une agrégation des LUVs qui s'accrochent les uns aux autres. Au sein de ces agrégats apparaît des structures hexagonales. Celles-ci sont généralement caractérisées par la présence de cercles d'épaisseur de 8-9 nm possédant un arrangement hexagonal, correspondant à une vue transversale (Figure II-18 E, tête de flèche). La visualisation de couches de tubes caractérise également une structure hexagonale et correspond à une vue longitudinale de celle-ci (Figure II-18 E, flèche).

Ces exemples montrent que la cryomicroscopie permet donc une visualisation des objets formés par les lipides dans l'eau. Nous verrons que cette technique nous a été utile pour caractériser plus en détails nos dispersions aqueuses constituées de PPIs.

III. Polymorphisme des Phosphoinositides en fonction du pH et de la température

III.1 Introduction

Les phosphoinositides (PPIs) joueraient un rôle important lors de la formation de l'enveloppe nucléaire. Deux populations de membranes essentielles à la formation *in vitro* de l'enveloppe nucléaire, MV1 et NERs, sont fortement enrichies en PPIs (60 % molaire des phospholipides) (Collas et Poccia, 1995 ; Collas et Poccia, 1996). En raison de la forte concentration en PPIs dans les membranes MV1 et NERs, il a été supposé que ces lipides interviendraient au niveau structural en agissant sur les propriétés membranaires (Larijani et Poccia, 2007; Larijani et Poccia, 2008 ; Poccia and Larijani, 2009). Bien que l'implication des phosphoinositides en signalisation cellulaire soit maintenant bien établie, leurs propriétés biophysiques restent encore peu étudiées. Le but de ce chapitre sera donc d'apporter de nouvelles informations sur les propriétés structurales et dynamiques de ces lipides et plus particulièrement en fonction de la température et du pH.

Nous avons étudié quatre phosphoinositides insaturés: le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylinositol phosphorylé en position 4 (PI-4-P), le phosphatidylinositol diphosphate phosphorylé en position 4 et 5 (PI-4,5-P₂), le phosphatidylinositol triphosphate phosphorylé en position 3, 4 et 5 (PI-3,4,5-P₃). Ces lipides ont été choisis en particulier car nous les retrouvons en majorité dans les membranes naturelles MV1 et NERs. Deux techniques ont été utilisées dans le cadre de cette étude : la RMN des solides (sur les noyaux phosphore et deutérium) et la cryomicroscopie électronique. La première technique a permis de mettre en évidence la structure et la dynamique de membranes constituées de phosphoinositides, tandis que la deuxième technique a donné l'opportunité d'étudier la morphologie de ces membranes.

III.2 Les paramètres d'acquisition des expériences de RMN

III.2.1 Les paramètres pour la RMN du phosphore

Les expériences de RMN du phosphore ont été réalisées à 162 MHz and 283 MHz au moyen d'une séquence d'écho de Hahn (voir chapitre II; Rance, 1983). Les paramètres d'acquisition sont les suivants: fenêtre spectrale de 75-150 kHz, impulsion à 90 ° de 5,5 à 12,20 µs suivant la puissance utilisée, délai entre les impulsions de 30 à 50 µs et un temps de recyclage de 5 s. 5k scans ont été enregistrés pour les spectres de RMN du phosphore. Un LB (« Line Broadening ») de 50 à 100 Hz a été appliqué avant la transformée de Fourier. Les déplacements chimiques du phosphore ont été référencés par rapport à l'acide phosphorique à 85% (0 ppm).

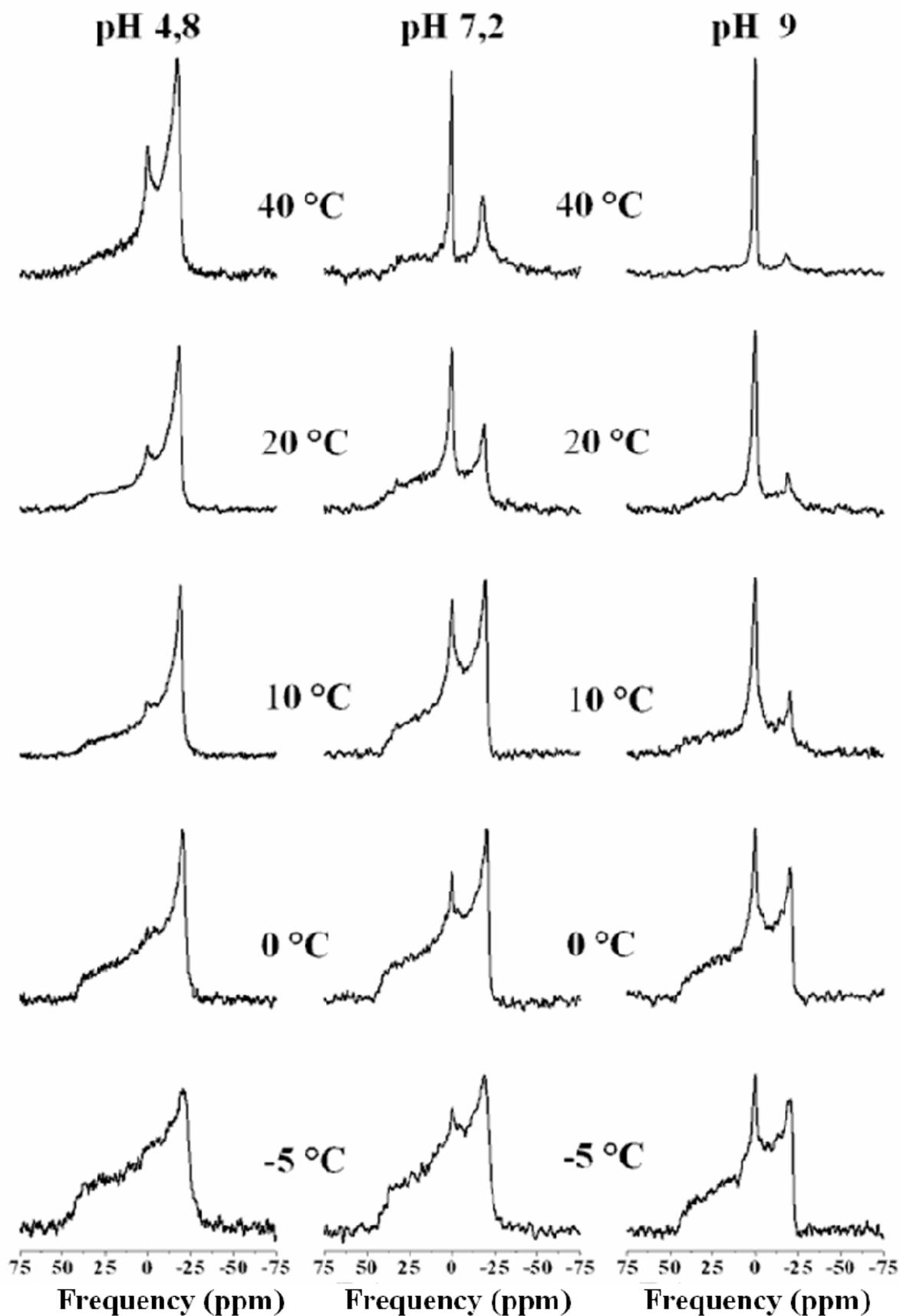


Figure III-1 Spectres de RMN du phosphore de dispersions aqueuses de phosphatidylinositol (PI) en fonction du pH et de la température. Les échantillons sont hydratés à 95% (w/w) dans un tampon acétate pour les études à pH 4,8, dans un tampon MOPS pour les études à pH 7,2 et dans un tampon CHES pour les études à pH 9. Les températures sont indiquées sur la figure. Tous les spectres sont référencés par rapport à H_3PO_4 85% (0 ppm). Le nombre de scans est de 5120 et un LB (« Line Broadening ») de 100 Hz a été appliqué.

III.2.2 Les paramètres pour la RMN du deutérium

Les expériences de RMN de deutérium ont été enregistrées à 107 MHz au moyen d'une séquence d'écho quadrupolaire (voir chapitre II; Davis, 1976). Les paramètres d'acquisition sont les suivants : fenêtre spectrale de 500 kHz, impulsion 90° de 5 μ s pour une puissance de 391 W, délai d'écho de 30 μ s. Le temps de recyclage est de 1,5 secondes. Les spectres du deutérium ont été obtenus à partir 50k-100k scans (0,1 mg de POPC_{d31}). Un LB (« Line Broadening ») de 200 à 300 Hz a été appliqué avant la transformée de Fourier.

III.3 Etude par RMN du phosphore du polymorphisme des phosphoinositides (PPIs) en fonction du pH et de la température

III.3.1 Polymorphisme du Phosphatidylinositol (PI)

a) Spectres de RMN du phosphore

La figure III-1 présente les spectres de RMN du phosphore de dispersions aqueuses de PI acquis à différentes températures et à différents pH. Les températures étudiées vont de -5 °C à 40 °C. Trois pH ont été étudiés : pH 4,8 (tampon acétate : 10 mM CH₃COOH/CH₃COONa), pH 7,2 (tampon MOPS : 1mM C₇H₁₅NO₄S, 100 mM KCl) et pH 9 (tampon CHES : 10 mM C₈H₁₇NO₃S, 100 mM KCl).

A pH 4,8, des spectres de poudre à symétrie axiale caractéristiques d'une phase lamellaire sont observés de -5 °C à 10 °C. Les deux extrémités du spectre correspondent aux orientations $\beta = 90^\circ$ (pic le plus intense) et $\beta = 0^\circ$, respectivement (β : angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique). Entre -5 °C et 0 °C, nous notons une transition de phase qui s'apparenterait à une transition lamellaire gel/lamellaire fluide. En effet, nous passons d'un spectre large typique d'une phase essentiellement à l'état gel (symétrie axiale conservée mais un temps de relaxation transversale plus court qui induit un élargissement des raies) à un spectre rétréci typique d'une phase fluide (Dufourc, 1992). De 10 °C à 40 °C, une raie isotrope centrée sur -0,4 ppm se superpose aux spectres de poudre à symétrie axiale. La contribution isotrope pourrait provenir de la formation d'objets de petite taille (micelles, SUVs) dont la dynamique est rapide par rapport à l'échelle de temps de la RMN, autrement dit dont le temps de corrélation (mouvement brownien) devient plus petit que le temps caractéristique d'une expérience RMN (de l'ordre de la μ s). De ce fait, l'anisotropie est

entièrement moyennée au cours du temps et seule la composante isotrope est observée. Le même phénomène est observé dans le cas d'une phase cubique dont la haute symétrie entraîne également une moyenne de l'anisotropie. Sur nos spectres, l'intensité de la raie isotrope augmente avec la température. La valeur -0,4 ppm correspond au déplacement chimique isotrope de PI dans l'eau. Nous avons confirmé cette valeur par RMN à rotation à l'angle magique sur cet échantillon (résultat non montré). Comme il a été expliqué précédemment dans le chapitre II, cette technique permet d'obtenir un spectre haute résolution comme en RMN du liquide à partir d'un échantillon de type solide.

A pH 7,2, nous obtenons des spectres caractéristiques d'un mélange de phase lamellaire et de phase isotrope sur toute la gamme de températures. En effet, la superposition d'un spectre de poudre à symétrie axiale avec un spectre isotrope est observée pour chaque température. L'intensité de la raie isotrope augmente avec l'élévation de la température. Nous constatons également que l'intensité du pic isotrope est plus importante à pH 7,2 qu'à pH 4,8 sur toute la gamme de températures. Ceci traduirait une augmentation du nombre de petits objets (ou de phase cubique) à pH 7,2.

A pH 9, nous sommes également en présence d'un mélange de phase lamellaire et de phase isotrope de -5 °C à 40 °C. A 40 °C, la phase isotrope semble dominer les spectres mais nous constatons encore une contribution lamellaire à la base du spectre. Nous constatons également que la composante isotrope est plus importante à ce pH (comparé aux deux autres pH) sur toute la gamme de températures.

b) Détermination de l'anisotropie de déplacement chimique de PI

A partir des spectres obtenus, nous avons mesuré les anisotropies de déplacement chimique ($\Delta\sigma$) de PI pour les différentes températures et pH. L'anisotropie de déplacement chimique correspond à la différence entre les deux extrémités des spectres de poudre (voir chapitre II). Ce paramètre dépend de la dynamique et de l'organisation des phospholipides au sein de la membrane. Nous avons également simulé quelques spectres obtenus pour PI. A titre d'exemple, la figure III-2 montre la comparaison entre un spectre expérimental de PI (pH 7,2 et T = 10°C) et un spectre simulé. Le spectre a été simulé à partir des $\Delta\sigma$ mesurés directement sur le spectre expérimental et en tenant compte de la contribution isotrope. Les paramètres de simulation sont présentés dans le tableau III-1. Nous constatons une bonne correspondance entre le spectre expérimental et le spectre simulé (les variations se trouvant dans l'erreur), validant ainsi notre attribution. Nous verrons que cette deuxième méthode sera très utile pour les lipides PIP et PIP₂ dont la détermination des $\Delta\sigma$ directement sur les spectres sera parfois compliquée.

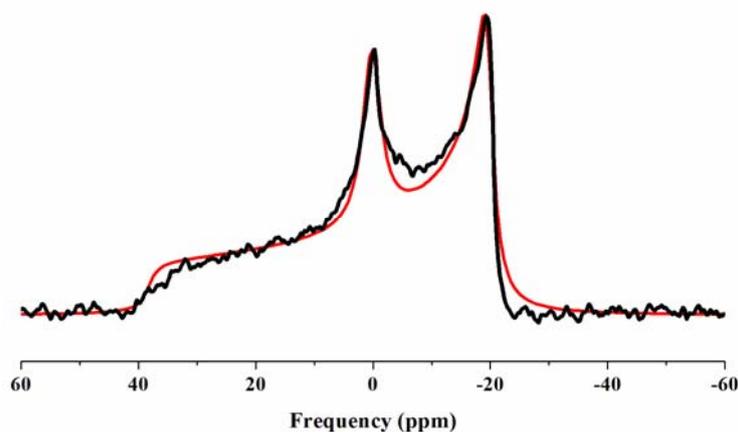


Figure III-2 Comparaison entre un spectre RMN du phosphore expérimental et un spectre RMN du phosphore obtenu par simulation pour PI. Le spectre expérimental (en noir) a été obtenu à pH 7,2 et à 10 °C. En rouge est représenté le spectre simulé de PIP. Les paramètres de simulation permettant d'obtenir ce spectre sont donnés dans le tableau III-1.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire
PI	-60	400	-0,4	1
Pic isotrope	0	600	-0,4	0,15

Tableau III-1 Paramètres de simulation d'un spectre de poudre de dispersion aqueuse de PI à pH 7,2. La simulation a été effectuée à partir de données extraites du spectre expérimental de PI à 10 °C.

Lipides	pH	Température (°C)	$\Delta\sigma$ (ppm)
PI	4,8	-5	-67±2
		0	-60±2
		10	-58±2
		20	-56±2
		40	-57±2
PI	7,2	-5	-63±2
		0	-62±2
		10	-57±2
		20	-54±2
		40	-53±2
PI	9	-5	-65±2
		0	-64±2
		10	-60±2
		20	-57±2
		40	-54±2

Tableau III-2 Anisotropie de déplacement chimique de PI en fonction de la température et du pH. Trois pH ont été étudiés : pH 4,8, pH 7,2 et pH 9. La gamme de température étudiée se situe de -5 °C à 40 °C. L'erreur est estimée à plus ou moins 2 ppm. $\Delta\sigma$ est déterminé directement sur les spectres ou par simulation spectrale.

A pH 4,8, nous obtenons des valeurs de $\Delta\sigma$ allant de -67 ± 2 ppm à -57 ± 2 ppm (Tableau III-2). Nous constatons une baisse significative de $\Delta\sigma$ entre -5°C et 0°C . Cette baisse pourrait être attribuée à une transition de phase gel/fluide (comme nous l'avons mentionné lors de l'étude spectrale) ou à un changement d'orientation de la tête polaire des lipides. A pH 7,2, l'anisotropie décroît de -62 ± 2 à -53 ± 2 ppm sur la gamme de températures étudiée (Tableau III-2). Nous constatons une légère diminution de $\Delta\sigma$ entre les températures 0°C et 10°C . Enfin pour un pH de 9, $\Delta\sigma$ varie de -65 ± 2 à -54 ± 2 ppm.

Pour les trois pH, $\Delta\sigma$ diminue avec l'augmentation de la température. Ceci se traduit par une augmentation de la dynamique de la tête polaire avec l'élévation de la température qui engendre donc une diminution de la largeur du spectre. Nous avons également constaté que le pH n'influe pas manière significative sur l'anisotropie de déplacement chimique.

c) Quantification de la composante isotrope des spectres de RMN du phosphore

A partir des spectres de RMN du phosphore, nous avons quantifié les composantes lamellaires et isotropes présentes dans les dispersions de PI étudiées (se rapporter au chapitre II). Pour cela, il suffit de simuler un spectre isotrope d'un noyau phosphore, de le soustraire au spectre RMN expérimental et enfin d'intégrer le spectre expérimental et le spectre soustrait (qui ne représente plus que la contribution lamellaire). L'aire des spectres étant proportionnelle à la quantité de lipides considérés, l'intégration nous permet de déterminer la quantité de lipides contenue dans la phase isotrope et dans la phase lamellaire. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure III-3. Les résultats sont présentés sous forme d'un graphique à 3 dimensions : une dimension pour le pH, une dimension pour la température et enfin une dimension pour le pourcentage d'isotropie présent dans l'échantillon. Afin de faciliter la lecture de ce graphe, la projection sur le plan XY (soit le plan température/composante isotrope) des données a été représentée (courbe rouge) ainsi que la projection sur le plan YZ (plan composante isotrope/pH : courbe verte).

A pH 4,8, le système se trouve en phase lamellaire (%iso = 0 ± 5 %) jusqu'à 20°C puis la composante isotrope augmente pour atteindre un pourcentage de 11 ± 5 % à 40°C (Figure III-3 données■). A pH 7,2, la composante isotrope augmente de manière plus significative en fonction de la température et représente 30 ± 5 % à 40°C (Figure III-3 données●). La même tendance est observée à pH 9 mais de manière plus prononcée qu'à pH 7,2. En effet, à 40°C , nous obtenons un pourcentage de composante isotrope de 55 ± 5 % (Figure III-3 ▲).

Ces résultats nous permettent d'avancer que pour PI l'élévation de la température entraîne la formation de phase isotrope (au sens de la RMN). De plus, le pourcentage de composante isotrope augmente également avec le pH.

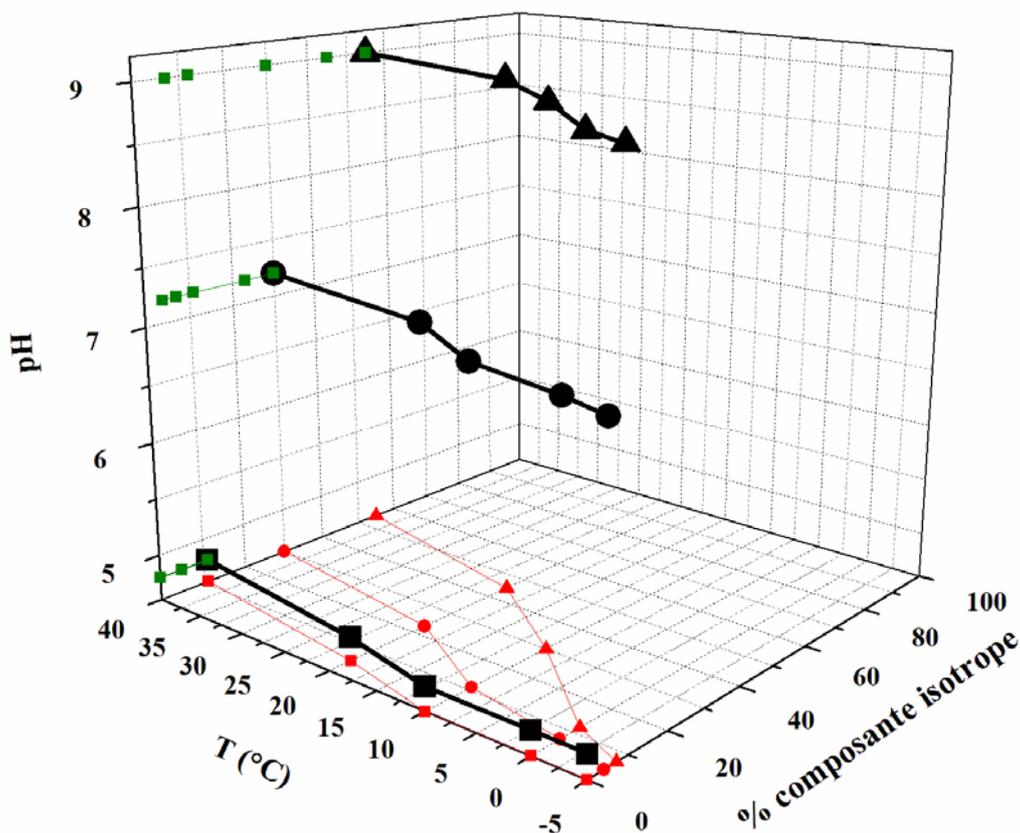


Figure III-3 Pourcentage de phase isotrope dans une dispersion aqueuse de PI en fonction de la température et du pH. Les échantillons sont hydratés à 95% dans un tampon acétate pour pH 4,8, tampon MOPS pour pH 7,2 et dans un tampon CHES pour pH 9. La gamme de températures étudiée se situe de -5°C à 40°C. Les données représentées par ■ correspondent aux études faites à pH 4,8, par ● à pH 7,2, enfin par ▲ au pH 9. Les données en rouge correspondent à la projection sur le plan XY (plan Température/Composante isotrope) des résultats. Les données en vert correspondent à la projection sur le plan YZ (plan Composante isotrope/pH) des résultats. L'erreur expérimentale est contenue dans la taille des symboles (noirs).

III.3.2 Polymorphisme du phosphatidylinositol-4-monophosphate (PIP)

a) Spectres de RMN du phosphore

La figure III-4 présente les spectres RMN du phosphore de dispersions aqueuses de PIP en fonction du pH et de la température. Les spectres de RMN du phosphore de PIP sont plus complexes que ceux de PI en raison de la présence d'un phosphore supplémentaire. En effet, PIP contient deux phosphores, un phosphodiester reliant les chaînes d'acide gras du lipide à la tête polaire et un phosphomonoester situé en position 4 du cycle inositol (P4). Les spectres obtenus sont donc le résultat de la superposition de deux spectres de poudre (un pour chaque phosphore présent).

A pH 4,8, nous observons deux spectres de poudre à symétrie axiale (caractéristiques d'une phase lamellaire) superposés sur toute la gamme de températures étudiées.

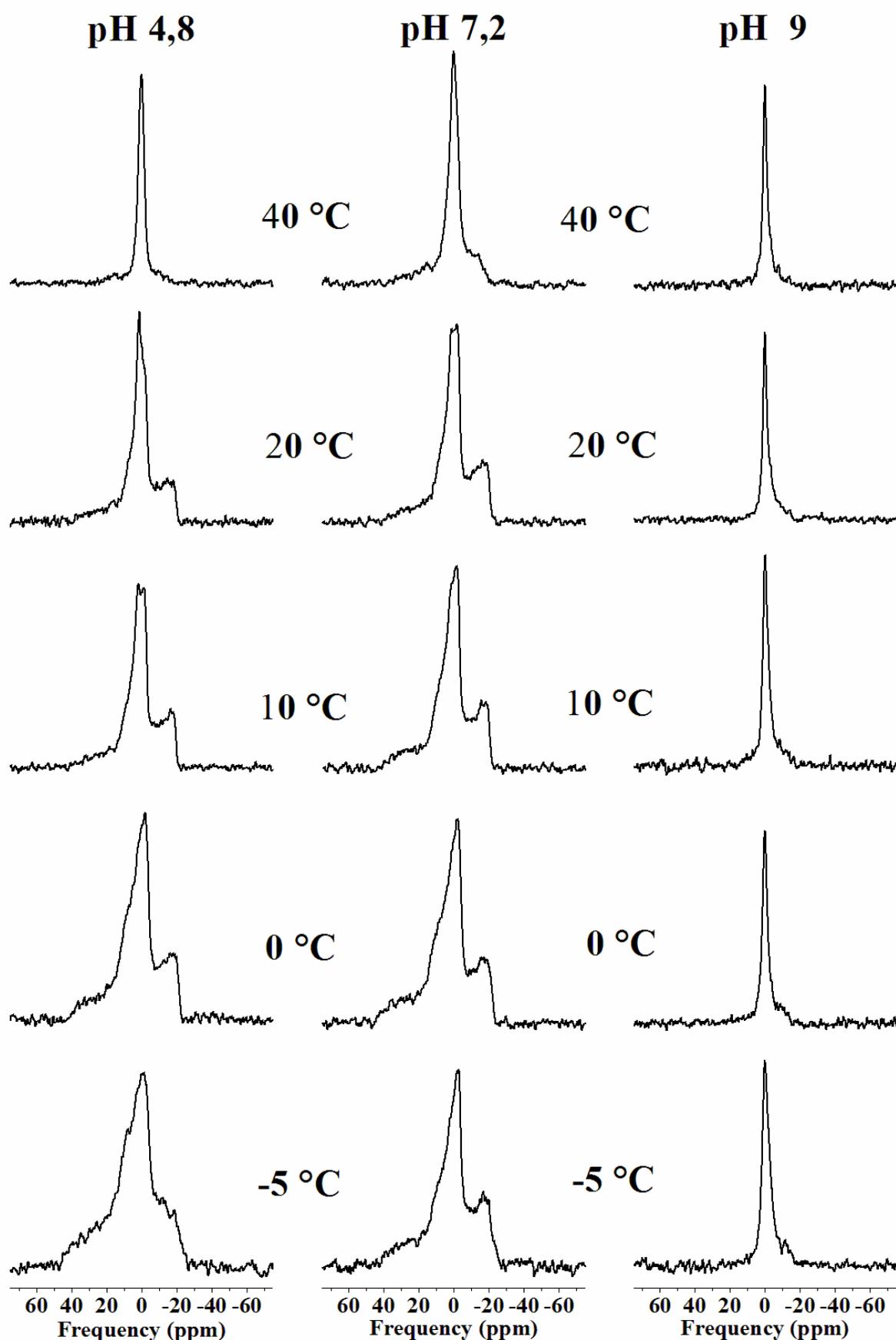


Figure III-4 Spectres RMN du phosphore de dispersions aqueuses de phosphatidylinositol monophosphate (PI-4-P) en fonction du pH et de la température. . Les échantillons sont hydratés à 95% dans un tampon acétate pour les études à pH 4,8, dans un tampon MOPS pour les études à pH 7,2 et dans un tampon CHES pour les études à pH 9. Les températures sont indiquées sur la figure. Tous les spectres sont référencés par rapport à H_3PO_4 85% (0 ppm). Ces spectres sont le résultat de 5120 acquisitions.

Il semblerait que nous ayons le passage d'une phase lamellaire à l'état quasiment gel (spectre plus large) à une phase lamellaire fluide entre -5°C et 0°C . De 10°C à 40°C , une raie isotrope centrée sur 1,5 ppm et dont l'intensité augmente avec l'élévation de la température, apparaît sur les spectres. Comme précédemment, une expérience de rotation à l'angle magique sur cet échantillon nous a permis de confirmer ce déplacement chimique isotrope. Le spectre obtenu a révélé la présence de deux pics: un à -0,4 ppm attribué au phosphodiester de PIP (par analogie avec PI) et un à 1,5 ppm attribué au phosphomonoester P4 (spectre non montré). Sur nos spectres statiques, nous n'observons pas le pic isotrope à -0,4 ppm. Nous supposons alors qu'il se trouve sous l'enveloppe spectrale.

A pH 7,2, nous obtenons essentiellement des spectres de poudre à symétrie axiale caractéristiques d'une phase lamellaire de -5°C à 10°C . A 20°C et 40°C , il apparaît une contribution isotrope. Néanmoins, la contribution lamellaire reste majoritaire.

A pH 9,6, nous sommes en présence d'un mélange de phase lamellaire (partie large à la base du spectre) et de phase isotrope (partie étroite et intense) de -5°C à 20°C . A 40°C , la phase isotrope apparaît majoritaire. Nous constatons qu'à ce pH, la composante isotrope a largement augmenté comparée aux deux autres pH.

b) Détermination des anisotropies de déplacement chimique de PIP

Les anisotropies de déplacement chimique ont été déterminées à l'aide des deux méthodes complémentaires déjà décrites. A titre d'exemple, la figure III-5 montre la comparaison entre un spectre expérimental (pH 7,2 à 10°C) et un spectre simulé à l'aide du programme de simulation. Nous pouvons constater que la superposition est satisfaisante puisque les écarts entre les deux spectres sont compris dans la gamme d'erreur estimée (rapport signal sur bruit du spectre expérimental). Dans ce cas précis, les deux anisotropies ont pu être directement mesurées sur les spectres. Les déplacements chimiques isotropes précédemment déterminés ont été utilisés. Le poids des deux phosphores présents dans PIP est équivalent (soit un pour un). Nous avons ensuite optimisé les conditions de simulation en jouant sur le paramètre $1/\pi T_2$ (correspondant à la largeur de raie à mi-hauteur) et en tenant compte de la composante isotrope. Le tableau III-3 donne les paramètres de simulation utilisés.

A pH 4,8, les $\Delta\sigma$ varient de -66 ± 2 ppm à -42 ± 10 ppm pour le phosphodiester (à 40°C , l'erreur de mesure a augmenté en raison de la forte intensité du pic isotrope et du spectre de poudre étroit qui domine le spectre) et de -14 ± 2 ppm à -12 ± 2 ppm pour le phosphomonoester P4 (Tableau III-4).

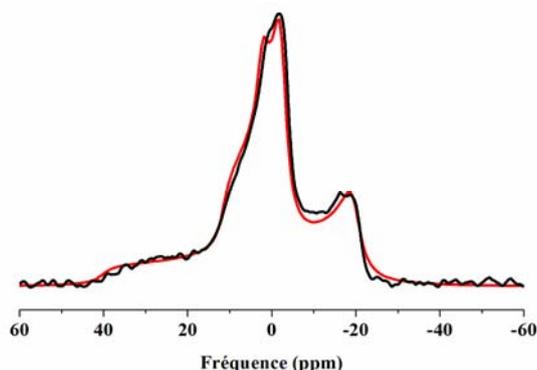


Figure III-5 Comparaison entre un spectre RMN du phosphore expérimental et un spectre RMN du phosphore obtenu par simulation pour PIP. Le spectre expérimental (en noir) a été obtenu à pH 7,2 et à 10 °C. En rouge est représenté le spectre simulé de PIP. Les paramètres de simulation permettant d'obtenir ce spectre sont donnés dans le tableau III-3.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire
<u>PI-4-P</u>	-60	700	-0,4	1
PI- <u>4-P</u>	-14	500	1,5	1
Pic isotrope	0	500	1,5	0,12

Tableau III-3 Paramètre de simulation d'un spectre de poudre de dispersion aqueuse de PIP à pH 7,2. La simulation a été effectuée à partir de données extraites du spectre expérimental de PIP à 10 °C.

Lipides	pH	Température (°C)	$\Delta\sigma_{PI}$ (ppm)	$\Delta\sigma_{PI}$ (ppm)
PIP	4,8	-5	-66±2	-14±5
		0	-58±2	-14±2
		10	-59±2	-12±2
		20	-56±2	-12±2
		40	-42±10	nd
PIP	7,2	-5	-65±5	-16±2
		0	-64±2	-16±2
		10	-59±2	-14±2
		20	-58±2	-12±2
		40	-53±2	nd
PIP	9	-5	-42±10	-9±5
		0	-40±10	-8±5
		10	-40±10	-8±5
		20	nd	nd
		40	nd	nd

Tableau III-4 Anisotropie de déplacement chimique de PIP en fonction de la température et du pH. Trois pH ont été étudiés : pH 4,8, pH 7,2 et pH 9. La gamme de températures étudiée se situe de -5 °C à 40 °C. $\Delta\sigma$ est déterminé directement sur les spectres ou par simulation spectrale.

Nous constatons une diminution du $\Delta\sigma$ du phosphodiester entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nous n'avons pu extraire l'anisotropie du phosphore P4 à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ car il est difficile de la séparer de la raie.

A pH 7,2, les anisotropies de déplacement varient de -62 ± 5 à -53 ± 2 ppm pour le phosphodiester et de -16 ± 2 à -12 ± 2 ppm (valeur non déterminée à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) pour le phosphomonoester P4 sur la gamme de températures étudiée.

Enfin pour pH 9, les $\Delta\sigma$ du phosphodiester et du phosphomonoester restent constants (-42 ± 10 à -40 ± 10 ppm et de -9 ± 5 à -7 ± 5 ppm : les variations observées se trouvent dans l'erreur et ne sont donc pas représentatives). Dans ce dernier cas, les $\Delta\sigma$ sont difficiles à obtenir étant donné que la raie isotrope domine les spectres.

Nous constatons que l'anisotropie de déplacement chimique du phosphodiester de PIP diminue avec l'élévation de la température, tandis que celle du phosphomonoester ne semble pas affecter de manière significative. De plus, le pH semble avoir peu d'influence sur les anisotropies de déplacement chimique du phosphodiester et du phosphomonoester de pH 4,8 à pH 7,2. A pH 9, il est difficile de tirer des conclusions en raison d'une forte imprécision.

c) Quantification de la composante isotrope des spectres de RMN du phosphore de PIP

Comme précédemment pour PI, nous avons quantifié le pourcentage des composantes lamellaires et isotropes présentes dans les dispersions de PIP à partir des spectres RMN du phosphore. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure III-6.

A pH 4,8, le système se trouve en phase purement lamellaire jusqu'à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (%iso < $5\pm 5\%$), puis nous observons une fraction importante de composante isotrope à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($35\pm 5\%$) (Figure III-6 données ■). A pH 7,2, la même tendance qu'à pH 4,8 est observée avec néanmoins un pourcentage de composante isotrope plus faible à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. En effet, nous obtenons $20\pm 5\%$ de composante isotrope à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figure III-6 données ●). A pH 9, la composante isotrope est plus importante dès $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et continue d'augmenter avec l'élévation de la température. En effet, nous passons d'un système contenant $35\pm 5\%$ de phase isotrope à $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ à un système composé de $65\pm 5\%$ de phase isotrope à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figure III-6 données ▲).

Nos résultats indiquent que le pourcentage de phase isotrope dans les dispersions aqueuses de PIP augmente avec la température. L'effet du pH sur le pourcentage de composante isotrope est plus complexe que celui observé pour PI. Entre pH 4,8 et 7,2, le pH n'influe pas de manière significative sur la composante isotrope pour les températures comprises entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

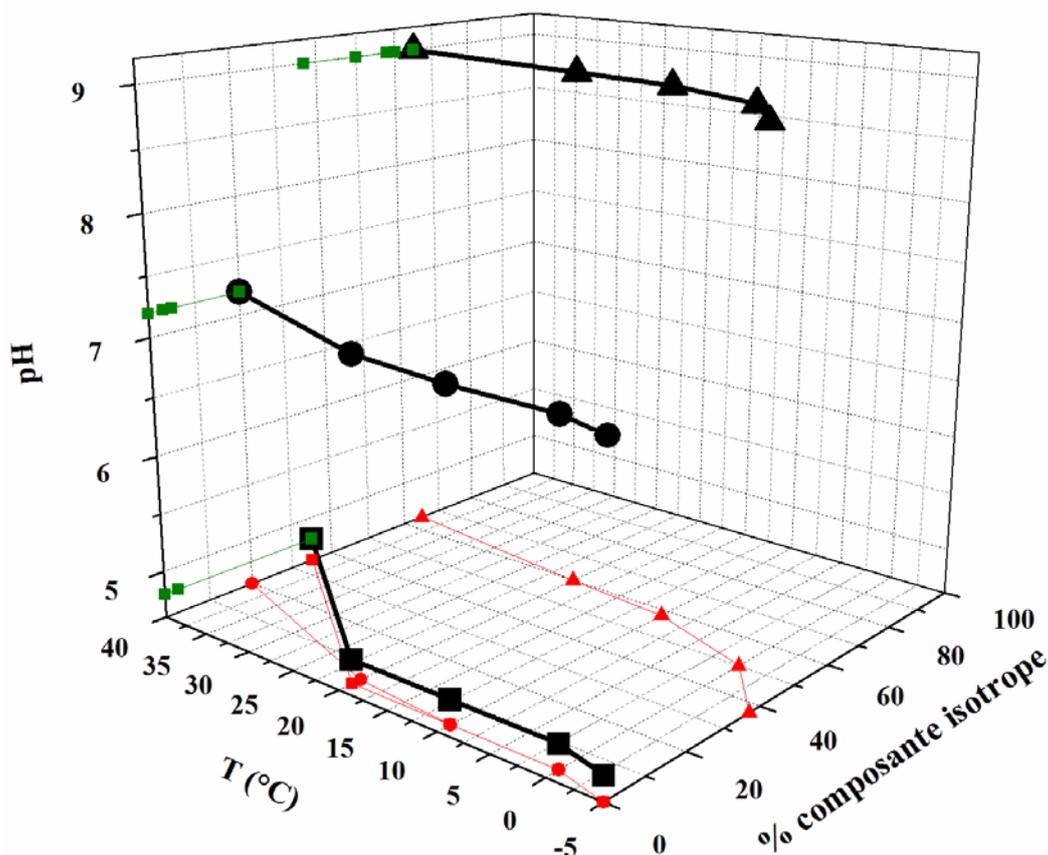


Figure III-6 Pourcentage de phase isotrope dans une dispersion aqueuse de PIP en fonction de la température et du pH. Les échantillons sont hydratés à 95% dans un tampon acétate pour pH 4,8, tampon MOPS pour pH 7,2 et dans un tampon CHES pour pH 9. La gamme de températures étudiée se situe de -5°C à 40°C. Les données représentées par ■ correspondent aux études faites à pH 4,8, par ● à pH 7,2, enfin par ▲ au pH 9. Les données en rouge correspondent à la projection sur le plan XY (plan Température/Composante isotrope) des résultats. Les données en vert correspondent à la projection sur le plan YZ (plan Composante isotrope/pH) des résultats. L'erreur expérimentale est contenue dans la taille des symboles.

A 40 °C et à pH 7,2, la composante lamellaire semble davantage stabilisée qu'à 4,8. A pH 9, nous observons une augmentation considérable de la composante isotrope à toutes les températures. Cet effet du pH sera discuté ultérieurement.

III.3.3 Polymorphisme du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂)

a) Spectres de RMN du phosphore-31

La figure III-7 présente les spectres de RMN du phosphore de dispersions aqueuses de PIP₂ en fonction du pH et de la température. PIP₂ comporte trois phosphores. L'un de ces phosphores est un phosphodiester reliant les chaînes d'acides gras du lipide à la tête polaire (cycle inositol). Les deux autres phosphores sont des phosphomonoesters situés en position 4 et 5 du cycle inositol (phosphore P4 et P5).

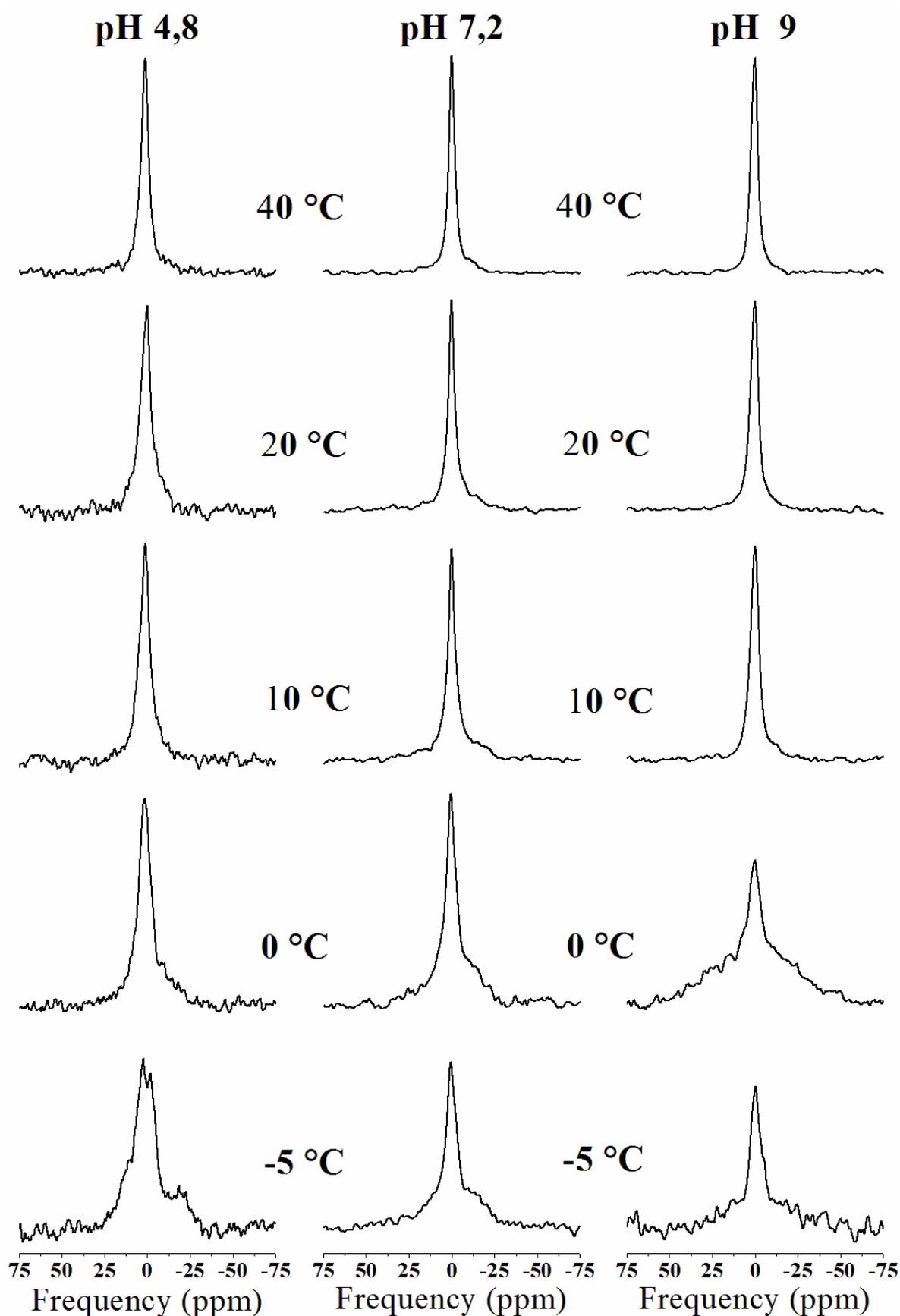


Figure III-7 Spectres RMN du phosphore de dispersions aqueuses de phosphatidylinositol diphosphate (PI-4,5-P₂) en fonction du pH et de la température. Les échantillons sont hydratés à 95% dans un tampon acétate pour les études à pH 4,8, dans un tampon MOPS pour les études à pH 7,2 et dans un tampon CHES pour les études à pH 9. Les températures sont indiquées sur la figure. Tous les spectres sont référencés par rapport à H₃PO₄ 85% (0 ppm). Nombre d'acquisitions : 6k scans.

Les spectres de RMN du phosphore seront donc le résultat de la superposition de trois anisotropies de déplacement chimique (une pour chaque phosphore présent).

A pH 4,8, nous observons le passage d'un système essentiellement lamellaire (à -5 °C) à un système qui semble majoritairement composé de phase isotrope. En effet, à 40 °C, le spectre est dominé par une raie isotrope intense.

A pH 7,2, nous observons le même phénomène. En effet, de -5 °C à 0 °C nous sommes majoritairement en phase lamellaire. A partir de 10 °C, la raie isotrope devient prédominante sur les spectres.

A pH 9,6, nous sommes clairement en présence d'une phase isotrope à partir de 10 °C. A basse température, la base des spectres est très large indiquant une importante diminution de la dynamique. Nous ne pourrions détailler plus les spectres en raison d'un faible rapport sur bruit. En effet pour cet échantillon, nous n'avons utilisé que 1 mg de lipides.

b) Détermination des anisotropies de déplacement chimique de PIP₂

Comme nous avons pu le constater sur les spectres de RMN, la composante isotrope est non négligeable et même majoritaire dans certains cas. La composante isotrope, plus intense, a tendance à dominer les spectres et rend donc difficile l'extraction des anisotropies de déplacement chimique de PIP₂. Le tableau III-5 répertorie les anisotropies de déplacement chimique déterminées pour PIP₂ à pH 4,8 et pH 7,2 (aucune valeur n'a pu être extraite à pH 9). Ces valeurs de $\Delta\sigma$ ont été déterminées soit directement sur les spectres soit à l'aide de la simulation des spectres phosphore.

A pH 4,8, l'anisotropie de déplacement chimique du phosphodiester a été déterminée à deux températures: -65 ± 5 ppm à -5 °C et -60 ± 5 ppm à 0°C. Le phosphore P4 du cycle inositol présente une anisotropie de déplacement chimique qui varie de -18 ± 2 à -14 ± 2 ppm entre -5 °C et 0 °C. La troisième anisotropie de déplacement chimique (concernant le phosphore en position 5 du cycle inositol) est plus faible que les précédentes et est estimée à -7 ± 3 ppm à -5 °C et -4 ± 2 ppm à 0 °C. Concernant les autres températures, la composante isotrope importante ainsi que le rapport signal sur bruit relativement faible ne permettent pas d'extraire les $\Delta\sigma$.

A pH 7,2, la détermination des $\Delta\sigma$ s'est également révélée difficile. Nous avons néanmoins pu mesurer l'anisotropie de déplacement chimique du phosphodiester sur toute la gamme de températures. Elle varie de -65 ± 5 ppm à -55 ± 5 ppm. Les $\Delta\sigma$ des phosphomonoesters P4 et P5 n'ont pu être extraites à partir des spectres.

Lipides	pH	Température (°C)	$\Delta\sigma_{\text{PIP}_2}$ (ppm)	$\Delta\sigma_{\text{PIP}_2}$ (ppm)	$\Delta\sigma_{\text{PIP}_2}$ (ppm)
PIP ₂	4,8	-5	-65±5	-18±3	-7±3
		0	-60±5	-14±2	-4±2
		10	nd	nd	nd
		20	nd	nd	nd
		40	nd	nd	nd
PIP ₂	7,2	-5	-65±5	nd	nd
		0	-55±5	-14±2	-3±2
		10	-55±10	nd	nd
		20	-60±10	nd	nd
		40	-55±10	nd	nd

Tableau III-5 Anisotropie de déplacement chimique de PIP₂ en fonction de la température et du pH. Trois pH ont été étudiés : pH 4,8, pH 7,2 et pH 9. La gamme de températures étudiée se situe de -5 °C à 40 °C. L'erreur est estimée à plus ou moins 2 ppm ou plus ou moins 5 ppm suivant les cas. En rouge sont représentées les données qui ont été déterminées à l'aide de simulation des spectres RMN du phosphore.

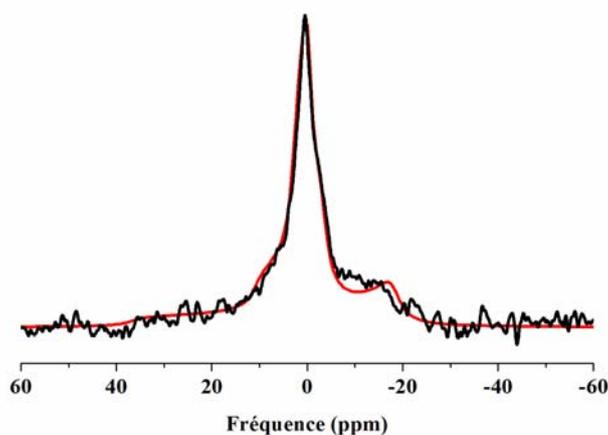


Figure III-8 Comparaison entre un spectre RMN du phosphore expérimental et un spectre RMN du phosphore obtenu par simulation pour PIP₂. Le spectre expérimental (en noir) a été obtenu à pH 7,2 et à 0 °C. En rouge est représenté le spectre simulé de PIP. Les paramètres de simulation permettant d'obtenir ce spectre sont donnés dans le tableau III-6.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire
<u>PI</u> -4,5-P	-55	700	-0,4	1
PI- <u>4,5</u> - <u>P</u> ₂	-14	500	1	1
PI-4, <u>5</u> - <u>P</u> ₂	-3	500	0,2	0,12

Tableau III-6 Paramètres de simulation d'un spectre de poudre de dispersion aqueuse de PIP₂ à pH 7,2. La simulation a été effectuée à partir de données extraites du spectre expérimental de PIP₂ à 0 °C.

En effet, les épaulements à 0° et 90° associés à ces spectres de poudres ne sont pas résolus. Nous avons effectué une étude par simulation du spectre de RMN du phosphore obtenu à 0 °C. Nous avons choisi cette température car le spectre de poudre associé au phosphodiester était plus résolu qu'à 10 °C (température qui nous intéresse généralement afin de pouvoir corréler nos observations au système biologique). Le résultat obtenu est présenté sur la figure III-8. Nous avons pris comme valeurs de départ pour les $\Delta\sigma$ des phosphomonoesters P4 et P5, celles que nous avons précédemment déterminées à pH 4,8. Nous avons donc commencé les simulations avec un $\Delta\sigma$ de -14 ppm pour le phosphore 4 et de -4 ppm pour le phosphore P5. Les déplacements chimiques isotropes précédemment déterminées ont été utilisés. Ensuite, nous avons optimisé les conditions de simulation afin d'obtenir une superposition des deux spectres satisfaisante (paramètres de simulation présentés dans le tableau III-5).

A pH 9, nous n'avons pas pu extraire les anisotropies de déplacement chimique des phosphores de PIP₂ notamment en raison de la présence importante d'une composante isotrope dans les spectres et d'un faible rapport signal sur bruit (à basse température).

A partir de ces résultats, il est donc difficile de tirer des conclusions pour PIP₂ concernant l'effet de la température et du pH sur les anisotropies de déplacement chimique. Nous avons constaté néanmoins que nous retrouvons des valeurs de l'ordre de -60 ppm pour l'anisotropie du phosphodiester et de -14 ppm pour le phosphomonoester P4, valeurs similaires à celles déterminées pour PIP. De plus, ces valeurs ne varient pas de manière significative entre pH 4,8 et pH 7,2 (comparaison sur les deux températures disponibles : -5 °C et 0 °C).

c) Quantification de la composante isotrope des spectres de RMN du phosphore de PIP₂

Pour compléter notre étude des dispersions aqueuses de PIP₂, nous avons déterminé le pourcentage de phase lamellaire et de phase isotrope présent dans les dispersions de PIP₂ à partir des spectres RMN du phosphore. Les résultats sont présentés sous forme d'un graphe à 3 dimensions (Figure III-9).

A pH 4,8, nous observons une augmentation de la composante isotrope en fonction de la température. Au départ, nous sommes en phase purement lamellaire (à -5°C, %iso= 0±5 %) puis la composante isotrope augmente pour atteindre un pourcentage de 50±5 % à 40°C (Figure III-9 ■).

A pH 7,2, la même tendance qu'à pH 4,8 est observée. En effet, nous passons de 0±5 % de phase isotrope à -5 °C à 45±5 % à 40 °C (Figure III-9 ●).

A pH 9, l'augmentation de la composante isotrope avec la température est plus significative. Nous passons d'un système contenant 35 ± 5 % de phase isotrope à 10°C à un système composé de 70 ± 5 % de phase isotrope à 40°C . En raison du faible signal sur bruit et de la forme large des spectres, nous n'avons pas fait de mesure de contribution à -5°C et 0°C .

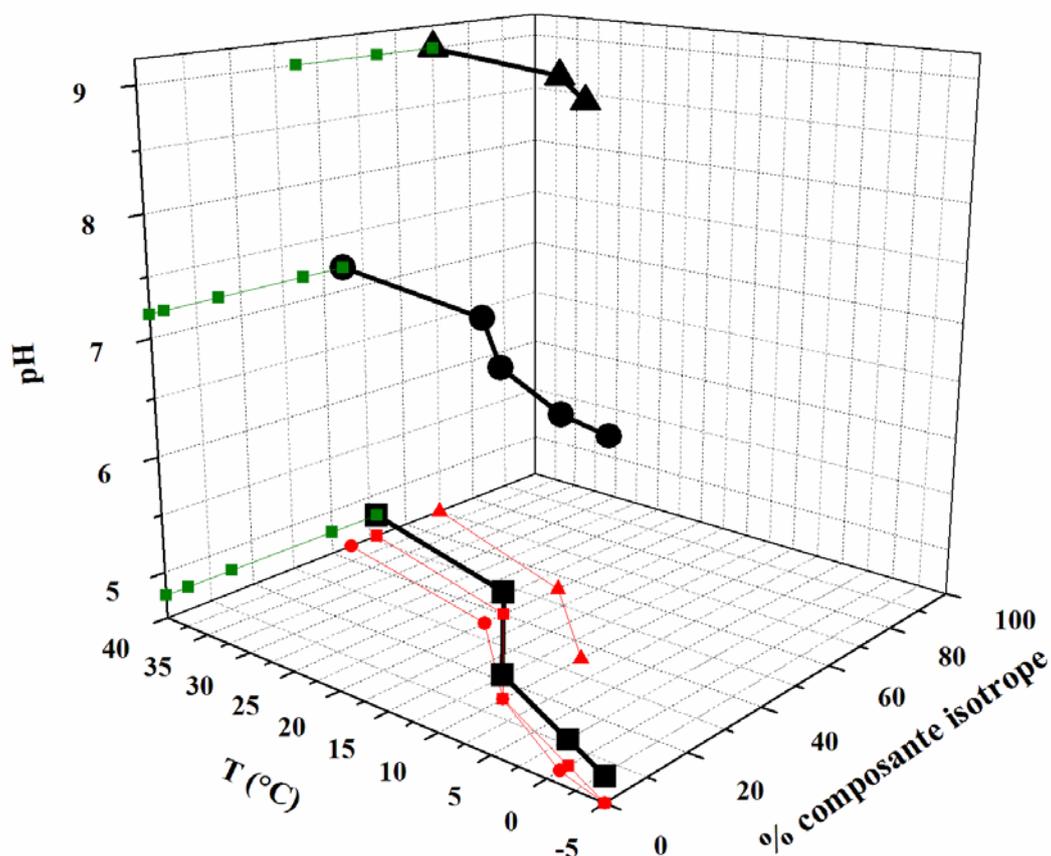


Figure III-9 Pourcentage de phase isotrope dans une dispersion aqueuse de PIP_2 en fonction de la température et du pH. Les échantillons sont hydratés à 95% dans un tampon acétate pour pH 4,8, tampon MOPS pour pH 7,2 et dans un tampon CHES pour pH 9. La gamme de températures étudiée se situe de -5°C à 40°C . Les données représentées par ■ correspondent aux études faites à pH 4,8, par ● à pH 7,2, enfin par ▲ au pH 9. Les données en rouge correspondent à la projection sur le plan XY (plan Température/composition isotrope) des résultats. Les données en vert correspondent à la projection sur le plan YZ (plan composition isotrope/pH) des résultats. L'erreur expérimentale est contenue dans les symboles.

Au trois pH étudiés, nous avons observé une élévation de la composante isotrope en fonction de la température. L'effet du pH est plus complexe. Comme observé pour PIP, le pH ne semble pas avoir d'influence sur la transition phase lamellaire/phase isotrope entre pH 4,8 et pH 7,2. A pH 9, nous observons une augmentation plus importante de la composante isotrope.

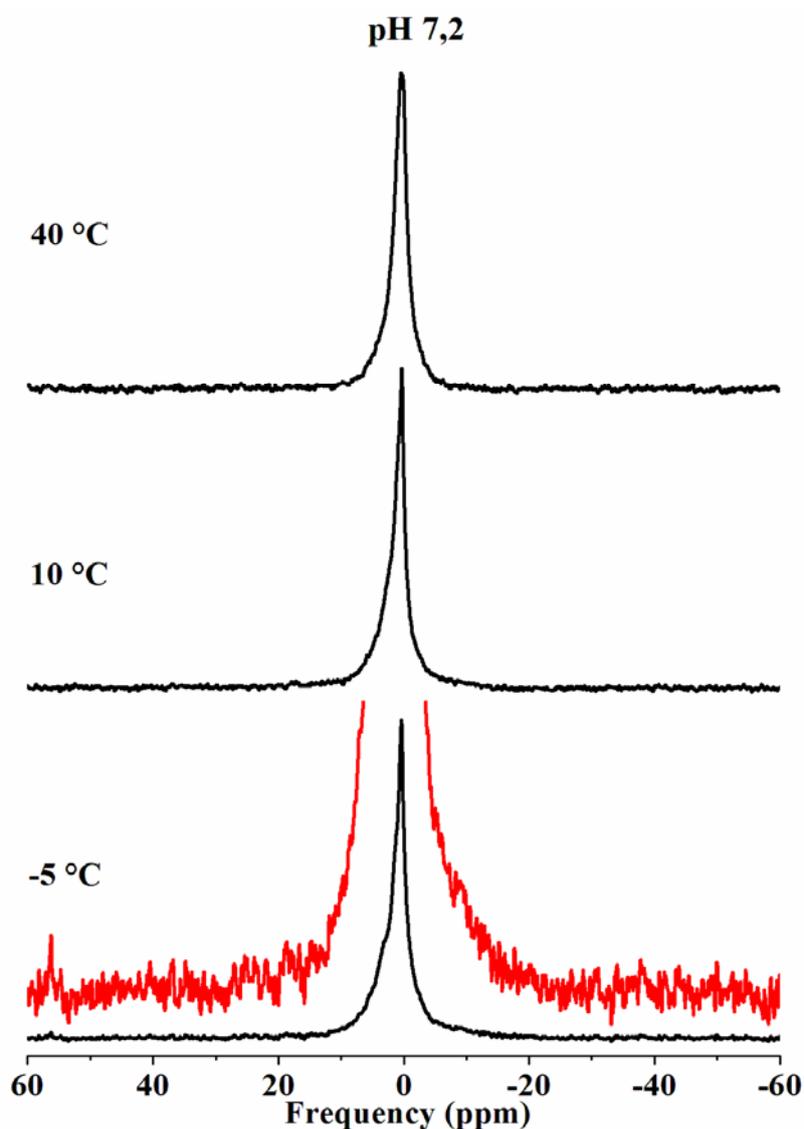


Figure III-10 Spectres RMN du phosphore de dispersions aqueuses de phosphatidylinositol triphosphate (PI-3,4,5-P₃) en fonction du pH et de la température. . Les échantillons sont hydratés à 95% dans un tampon MOPS pour les études à pH 7,2 (1 mg de lipides). Les températures sont indiquées sur la figure. Tous les spectres sont référencés par rapport à H₃PO₄ 85% (0 ppm). En rouge est représenté une expansion verticale du spectre de RMN du phosphore de PIP₃ à pH 7,2 et à -5 °C. Le nombre de scans est de 5120 scans.

III.3.4 Polymorphisme du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃)

a) Spectres de RMN du phosphore-31

La figure III-10 présente les spectres de RMN du phosphore de dispersions aqueuses de PIP₃ à pH 7,2 en fonction de la température (-5 °C à 40 °C). PIP₃ comporte quatre phosphores : un phosphodiester reliant les chaînes d'acides gras du lipide à la tête polaire (cycle inositol) et trois phosphomonoesters situés en position 3, 4 et 5 du cycle inositol (phosphore P3, P4, et P5). Les spectres de RMN du phosphore sont donc le résultat de la superposition des quatre anisotropies de déplacement chimique des phosphores présents dans PIP₃.

Sur toute la gamme de températures étudiée, les spectres de RMN de PIP₃ sont dominés par des spectres caractéristiques de phases isotropes. Cependant, la base des spectres est relativement large, ce qui laisse supposer la présence de phase lamellaire. Les spectres isotropes résultent de la perte de dépendance orientationnelle des spectres du fait de la formation de petits objets (ou d'objets à haute symétrie) dont la dynamique (ou la haute symétrie) est suffisante pour moyenniser l'anisotropie. Il est donc difficile d'accéder aux informations dites « solides » : dans notre cas les anisotropies de déplacement chimique des quatre phosphates présents dans PIP₃.

III.4 Etude de la dynamique de dispersions aqueuses de PPIs par RMN du deutérium

Les expériences que nous avons réalisées précédemment apportent des informations qualitatives sur la dynamique des phosphates, ainsi que sur la nature des objets (phase lamellaire, phase isotrope ou bien mélange des deux) au sein des dispersions aqueuses de phosphoinositides en fonction du pH et de la température. Il est aussi intéressant d'étudier la dynamique des chaînes lipidiques (soit au niveau du cœur hydrophobe de la membrane) au sein de ces dispersions aqueuses de lipides. Ceci est réalisable par RMN du deutérium sur des phospholipides dont les chaînes d'acides gras ont été deutérés (pour plus de détails voir chapitre II). Cependant, il existe peu de choix de phosphoinositides deutérés (par exemple, chez Avanti Polar Lipids seul le POPI deutéré est disponible) et de plus ils sont extrêmement coûteux. Nous avons donc décidé d'ajouter 10% molaire de POPC deutéré (16 :0 D31-18 :1 PC : POPC_{d31}) comme sonde de dynamique.

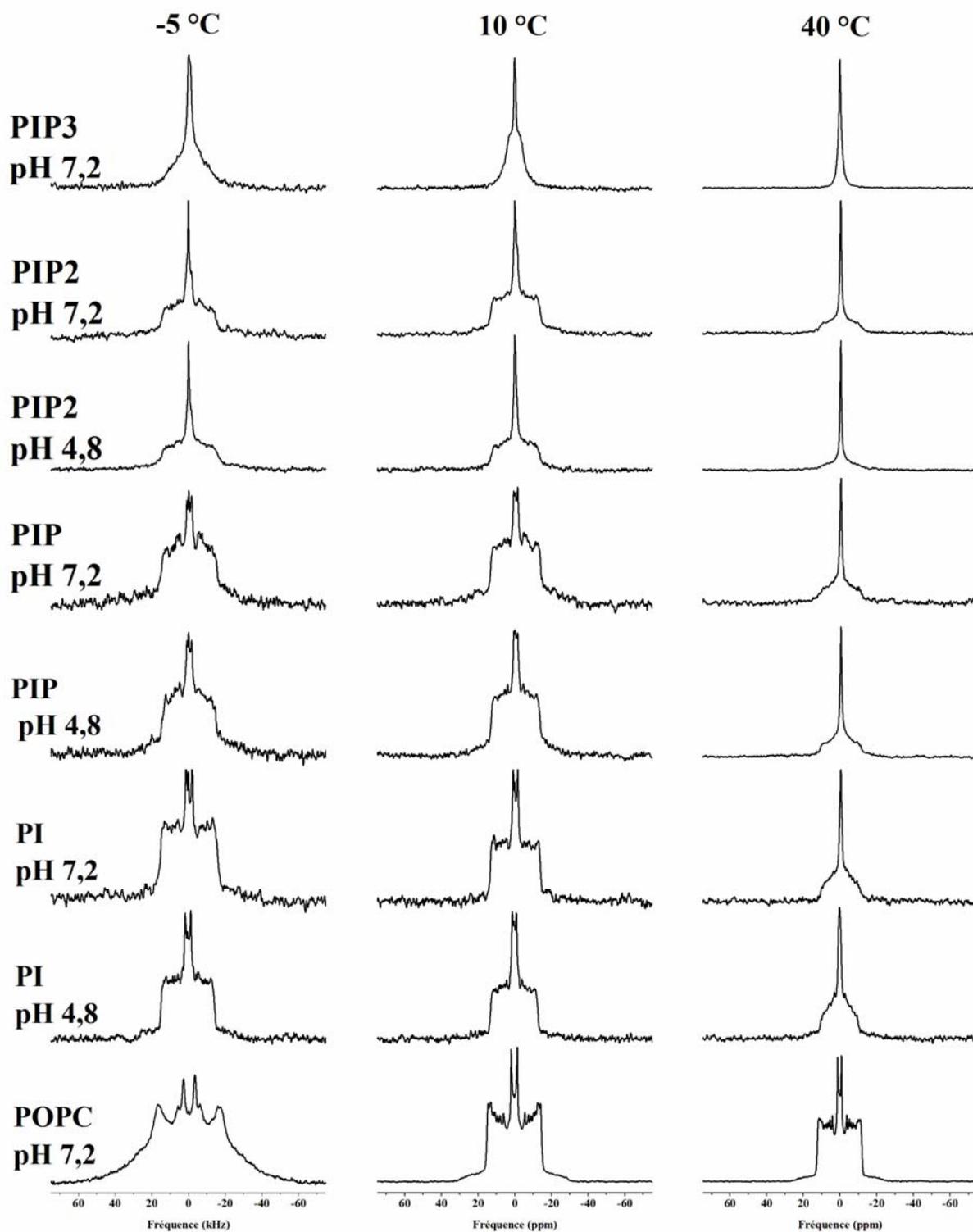


Figure III-11 Spectres de RMN du deutérium des systèmes PPIs/POPC_{d31} (90/10). L'échantillon est hydraté à 95% dans le tampon acétate dédeutééré pour les études à pH 4,8 et dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutééré pour les études à pH 7,2. Les températures sont indiquées en haut de l'image.

Il a été montré que l'incorporation d'un lipide marqué pour des ratios compris entre 0,2 :1 et 0,5 :1 (lipides marqués : lipides naturels) dans des membranes naturelles ne perturbait pas l'environnement naturel de la membrane (Garnier-Lhomme and al., 2007). Nous nous sommes basés sur le même principe en étudiant des systèmes binaires de POPC_{d31}/PPIs 10/90 afin de caractériser la dynamique de ces membranes.

III.4.1 Spectres de RMN du deutérium des dispersions aqueuses des PPIs en fonction du pH et de la température

La figure III-11 regroupe les principaux résultats obtenus pour PI, PIP, PIP₂ et PIP₃. Nous avons étudié deux pH 4,8 et 7,2 (sauf pour PIP₃ où seul le pH 7,2 a été considéré). Trois températures sont représentées : -5 °C, 10 °C et 40 °C. Tous nos spectres seront comparés aux ceux obtenus pour des liposomes de POPC_{d31}. Afin de simplifier la figure, seuls les spectres de POPC_{d31} à pH 7,2 ont été représentés car le pH n'a que très peu d'influence sur les dispersions de POPC.

Les spectres de POPC sont caractéristiques d'une phase lamellaire de type MLVs (distribution sphérique) avec une transition de phase aux alentours de -5 °C. Les pics les plus intenses correspondent aux groupements méthyles en bout de chaîne aliphatique. A -5 °C, nous pouvons observer un spectre large caractéristique d'une phase gel (il y a néanmoins une contribution de phase fluide : le système se trouve donc dans la zone de transition). En phase gel, la rotation du lipide n'est pas assez rapide pour induire la symétrie axiale. A 10 °C, nous sommes en présence d'une phase fluide dans laquelle les lipides tournent rapidement sur eux-mêmes et leurs chaînes présentent une grande mobilité. Ceci se traduit alors par l'apparition d'une symétrie axiale et d'un rétrécissement de la largeur des raies (Davis, 1979). A 40 °C, nous obtenons le même type de spectres qu'à 10 °C mais dont la largeur a diminué. Cette diminution est assimilée à l'augmentation de la dynamique au sein des MLVs due à l'élévation de la température.

a) Dispersions aqueuses de PI

La figure III-11 présente les spectres de RMN du deutérium de dispersions aqueuses de PI contenant 10% molaire de POPC_{d31} en fonction de la température. Pour les deux pH (4,8 et 7,2), nous constatons une abolition de la zone de transition de phase dans la gamme de températures étudiée. En effet, dès -5 °C, nous obtenons des spectres de poudre à symétrie axiale caractéristiques d'une phase lamellaire fluide. Ce phénomène a déjà été mentionné et il a été admis que PI diminue fortement la température de transition de phase d'une membrane

de PC (Larijani et Dufourc, 2006). En RMN du phosphore, nous avons mentionné la possibilité d'une transition de phase gel/fluide à $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ces résultats révèlent que nous avons déjà dépassé la température de transition de phase à $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, nous constatons que les spectres obtenus sont plus étroits que celui de POPC à la même température traduisant une augmentation de la dynamique au sein de la membrane. Ceci est observé aussi bien à pH 4,8 qu'à pH 7,2. A $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, la forme globale des spectres change. Bien que nous conservions une contribution lamellaire, nous constatons également l'apparition d'un pic isotrope intense et centré sur zéro. La présence d'une raie isotrope traduit la formation de petits objets ou de haute symétrie, comme il a été observé pour la RMN du phosphore. De plus, nous avons remarqué un élargissement des raies individuelles, traduisant un échange à vitesse intermédiaire entre la phase lamellaire et la phase isotrope. Si nous comparons maintenant la largeur des spectres de poudre obtenus à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, nous remarquons que celle-ci a diminué que ce soit par rapport aux spectres de PI à $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou par rapport au spectre de POPC pour la même température. Ceci pourrait traduire une augmentation de la dynamique des lipides contenus dans cette phase avec l'élévation de la température (comparaison entre les deux températures) ou bien être du à l'échange.

Nos résultats montrent qu'une membrane riche en PI présente un environnement plus dynamique que PC aussi bien à pH 4,8 qu'à pH 7,2.

b) Dispersions aqueuses de PIP

Nous avons ensuite étudié des dispersions aqueuses de PIP (contenant 10% de POPC_{d31}) à pH 4,8 et à pH 7,2 (Figure III-11).

A $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et au deux pH étudiés, nous obtenons des spectres caractéristiques d'une phase lamellaire fluide. Nous constatons également une contribution large à la base du spectre qui pourrait indiquer une contribution de phase gel. Cependant, étant donné le faible rapport signal sur bruit, nous ne pouvons affirmer cela avec certitude. A $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, nous observons un spectre de poudre caractéristique de MLVs plus étroits que le spectre obtenu pour POPC à la même température (Figure III-11). L'environnement créé par PIP présente donc une dynamique plus importante que pour POPC pur. Le spectre correspondant au pH 4,8 semble légèrement plus étroit que celui obtenu à pH 7,2. Cela indiquerait une augmentation du désordre, ce que nous étudierons plus en détails ultérieurement à l'aide des paramètres d'ordre. A 40°C , nous obtenons des spectres similaires à ceux obtenus pour PI à la même température et pour les deux pH, c'est-à-dire une superposition d'un spectre de poudre de type MLVs et un pic isotrope. Comme pour PI, un échange à vitesse intermédiaire entre la phase lamellaire et la phase isotrope est observé. Une estimation des composantes isotropes a

été effectuée et sera détaillée ultérieurement. Nous pouvons néanmoins noter que la raie isotrope semble plus importante à pH 4,8 qu'à pH 7,2 (ce qui serait en accord avec nos résultats de RMN du phosphore).

c) Dispersion aqueuses de PIP₂

Dans un troisième temps, nous avons étudié des dispersion aqueuses de PIP₂ à pH 4,8 et à pH 7,2 (Figure III-11).

Nous obtenons des spectres caractéristiques d'un mélange de phase lamellaire et de phase isotrope pour toutes les températures étudiées et pour les deux pH. Si l'on compare la largeur du spectre de poudre à celui obtenu pour POPC à la même température, nous constatons que celle-ci a diminué pour les deux conditions. L'environnement créé par PIP₂ présente donc une dynamique plus importante au niveau des chaînes lipidiques. La composition isotrope augmente avec la température. Il semblerait également que celle-ci soit plus importante à pH 4,8 qu'à pH 7,2, ce qui serait en accord avec nos résultats de RMN du phosphore. Un échange à vitesse intermédiaire entre la phase lamellaire et la phase isotrope est de nouveau observé à 40 °C.

d) Dispersion aqueuses de PIP₃

Nous avons ensuite étudié des dispersion aqueuses de PIP₃ à pH 7,2 (figure III-11). A -5 °C et 10 °C, nous obtenons une superposition d'un spectre de poudre, dont la largeur a considérablement diminué, et d'un spectre isotrope. Ceci signifie que nous sommes en présence d'un mélange d'une phase lamellaire (objet de taille intermédiaire) et d'une phase isotrope. A 40 °C, le spectre évolue considérablement puisqu'en effet nous n'obtenons plus qu'une seule raie isotrope. Il reste sûrement une faible contribution lamellaire car la base de ce spectre est relativement large pour un pic purement isotrope. On note également un échange à vitesse intermédiaire entre la phase lamellaire et la phase isotrope (élargissement des raies individuelles).

e) Détermination du paramètre d'ordre

A partir des spectres de RMN du deutérium, il est possible de déterminer le paramètre d'ordre S_{CD} (chapitre II). Ce paramètre informe sur la dynamique au niveau des chaînes lipidiques de la membrane. Un paramètre d'ordre proche de 1 équivaut à un milieu très fortement ordonné. Plus on se rapproche de zéro, plus le milieu est désordonné (et donc dynamique). Pour accéder au paramètre d'ordre, il suffit de mesurer l'éclatement quadrupolaire $\Delta\nu_Q$.

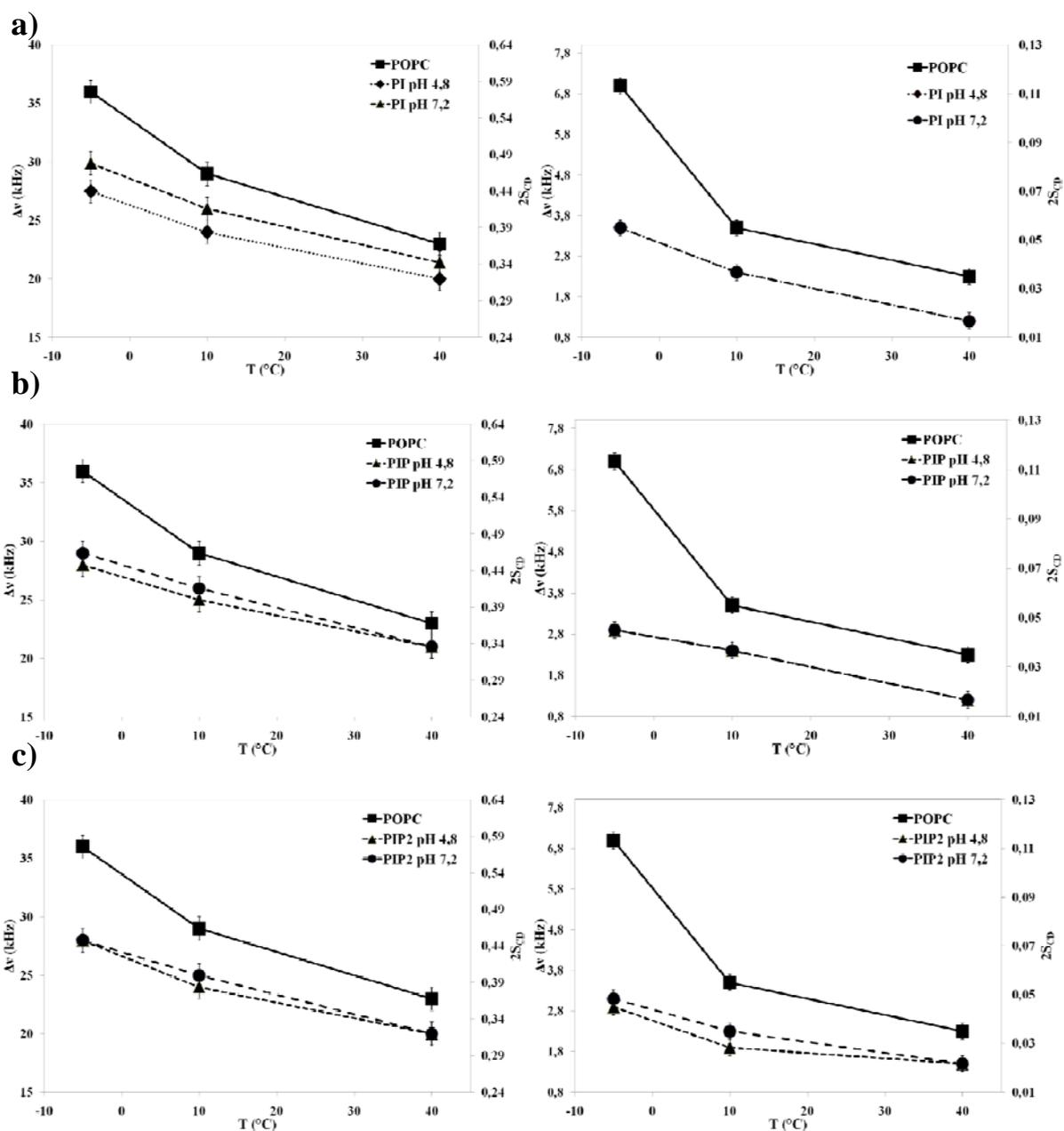


Figure III-12 Eclatements quadrupolaires et paramètres d'ordre de membranes contenant des PPIs en fonction de la température. Sur la colonne de gauche sont présentés les éclatements quadrupolaires et paramètres d'ordre obtenus au niveau de la région « plateau ». La colonne de droite montre les éclatements quadrupolaires et paramètres d'ordre de la région des méthyles se trouvant en bout de chaîne lipidique. a) PI/POPC_{d31} à pH 4,8 et à pH 7,2. b) PIP/POPC_{d31} à pH 4,8 et à pH 7,2. c) PIP₂/POPC_{d31} à pH 4,8 et à pH 7,2. Les ratios molaires de ces systèmes sont PPIs/POPC 90/10. L'erreur est estimée à ± 1 kHz ($\pm 0,02$ pour les paramètres d'ordre) sur la mesure de l'éclatement quadrupolaire au niveau de la région « plateau » et à $\pm 0,2$ kHz ($\pm 0,003$) au niveau des méthyles.

Dans notre cas, nous avons mesuré l'éclatement quadrupolaire au niveau de la région « plateau » (soit les carbones de la chaîne les plus proches de la tête polaire correspondants aux positions 2 à 8-10) ainsi qu'au niveau des méthyles en bout de chaîne (Figure III-12).

La figure III-12 a) montre l'évolution des éclatements quadrupolaires (axe vertical de gauche) et des paramètres d'ordre correspondants (axe vertical de droite) pour les systèmes POPC et POPC/PI (10/90) à pH 4,8 et 7,2. A ces deux pH, nous observons une baisse significative des paramètres d'ordre pour les systèmes POPC/PI comparé au système POPC. Nous constatons néanmoins une diminution de la dynamique moins significative à 40 °C et à pH 4,8. Au niveau des méthyles, nous obtenons la même information, mis à part à 40 °C où l'effet de fluidification est toujours ressenti de manière significative pour les deux pH. Nos résultats indiquent que nous avons une augmentation du désordre dans une membrane riche en PI, qui est en accord avec une étude précédente qui avait mentionné une augmentation de la dynamique en présence de PI (Larijani et Dufourc, 2006). Si nous comparons maintenant la dynamique de ces membranes pour les deux pH, nous constatons qu'à basse température le système à pH 7,2 présente une dynamique plus importante, puis à partir de 10 °C, les deux systèmes deviennent équivalents. Au niveau des méthyles, les deux systèmes présentent un désordre similaire sur toute la gamme de températures.

La figure III-12b montre l'évolution des éclatements quadrupolaires (et des paramètres d'ordre) au niveau des régions « plateau » et méthyles terminaux pour les systèmes POPC et POPC/PIP (10/90) à pH 4,8 et 7,2. Nous observons une baisse significative des paramètres d'ordre pour les systèmes POPC/PIP comparé au système POPC pour les deux pH. Nous constatons néanmoins une diminution de la dynamique moins significative à 40 °C. Au niveau des méthyles, l'augmentation de la dynamique est perçue sur toute la gamme de températures. Nos résultats montrent que nous avons une augmentation du désordre dans une membrane riche en PIP. En comparant les résultats obtenus pour les deux pH, nous constatons que les paramètres d'ordre obtenus à pH 4,8 et à pH 7,2 sont similaires sur toute la gamme de températures. Par exemple à 10 °C, nous obtenons des $2S_{CD\text{plateau}}$ de $0,40 \pm 0,02$ ($0,04 \pm 0,01$ au niveau des méthyles) à pH 4,8 et de $0,42 \pm 0,02$ ($0,04 \pm 0,01$) à pH 7,2.

Les mêmes observations que pour PIP ont été constatées pour PIP_2 (Figure IIIc). En effet, nous n'observons pas de différences significatives entre les paramètres d'ordre obtenus à pH 4,8 et à pH 7,2 aussi bien au niveau du « plateau » qu'au niveau des méthyles terminaux. Par exemple à 10 °C, nous obtenons des $2S_{CD\text{plateau}}$ de $0,38 \pm 0,02$ ($0,03 \pm 0,01$ pour les méthyles) à pH 4,8 et de $0,40 \pm 0,02$ ($0,04 \pm 0,01$ pour les méthyles) à pH 7,2.

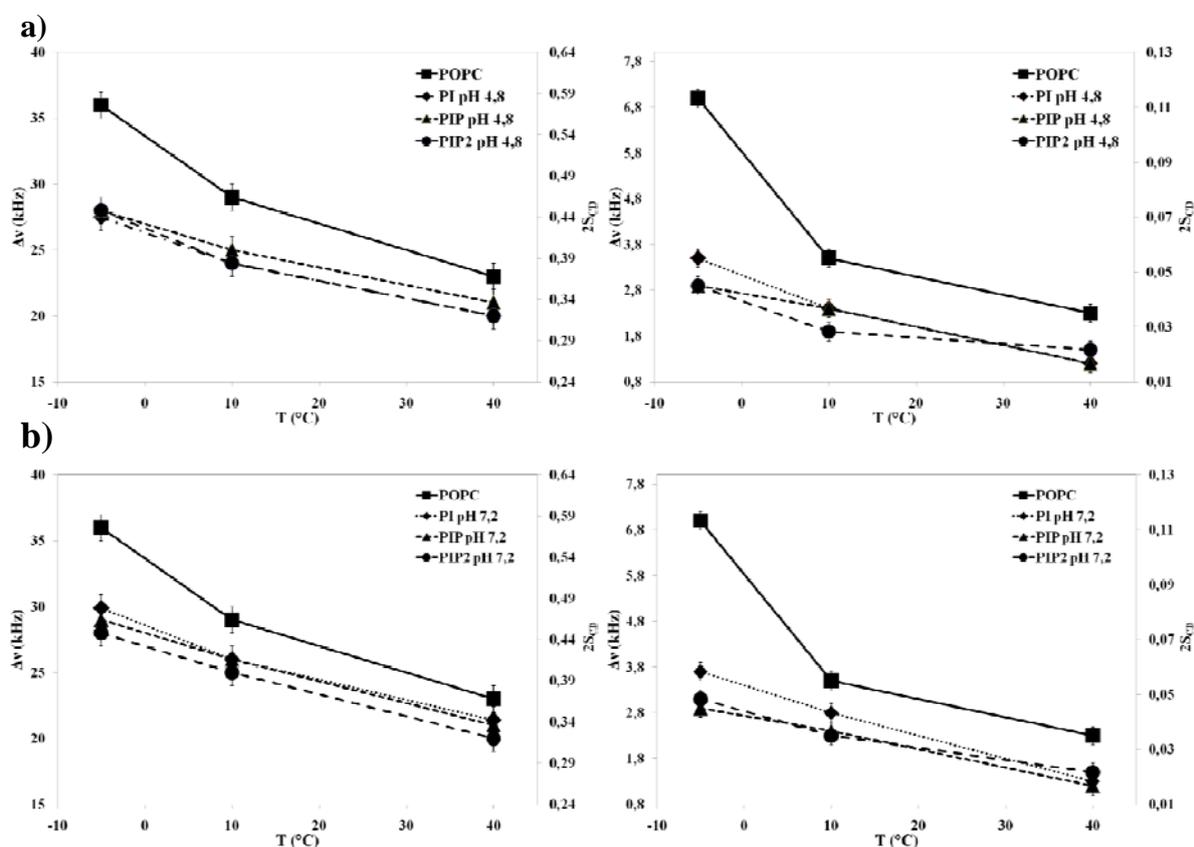


Figure III-13 Comparaison des éclatements quadrupolaires et des paramètres d'ordre de membranes riche en PI, PIP et PIP₂. Sur la colonne de gauche sont présentés les éclatements quadrupolaires et paramètres d'ordre de la région plateau. La colonne de droite montre les éclatements quadrupolaires et paramètres d'ordre de la région méthyle terminal. a) PI/POPC_{d31}, PIP/POPC_{d31} et de PIP₂/POPC_{d31} à pH 4,8. b) PI/POPC_{d31}, de PIP/POPC_{d31}, et de PIP₂/POPC_{d31} à pH 7,2. Les ratios molaires de ces systèmes sont PPIs/POPC 90/10. L'erreur est estimée à ± 1 kHz ($\pm 0,02$ pour les paramètres d'ordre) sur la mesure de l'éclatement quadrupolaire au niveau de la région « plateau » et à $\pm 0,2$ kHz ($\pm 0,003$) au niveau des méthyles.

Nous avons ensuite comparé les paramètres d'ordre obtenus pour les systèmes POPC/PI, POPC/PIP et POPC/PIP₂ à chaque pH (Figure III-13).

La figure III-13a montre les paramètres d'ordre obtenus pour ces trois systèmes à pH 4,8. Nous constatons que les paramètres d'ordre obtenus pour les membranes riches en PI, PIP et PIP₂ sont similaires aussi bien dans la région du « plateau » qu'un niveau des méthyles. Par exemple à 10 °C, nous obtenons des $2S_{CD\text{plateau}}$ de $0,38\pm 0,02$ ($0,03\pm 0,01$ pour les méthyles) pour le système riche en PI, de $0,40\pm 0,02$ ($0,04\pm 0,01$ pour les méthyles) pour le système riche en PIP et de $0,38\pm 0,02$ ($0,03\pm 0,01$ pour les méthyles) pour le système riche en PIP₂. Nos résultats indiquent que ces trois membranes présentent une dynamique similaire.

La même tendance est observée à pH 7,2 (Figure III-13b). Ces trois lipides donnent des paramètres d'ordre similaires sur toute la gamme de températures. Par exemple à 10 °C, nous obtenons des $2S_{CD\text{plateau}}$ de $0,42\pm 0,02$ ($0,04\pm 0,01$ pour les méthyles) pour le système riche en PI, de $0,42\pm 0,02$ ($0,04\pm 0,01$ pour les méthyles) pour le système riche en PIP et de $0,40\pm 0,02$ ($0,03\pm 0,01$ pour les méthyles) pour le système riche en PIP₂. Il est toutefois à noter pour PI, un ordre plus important aux autres systèmes au niveau des méthyles à -5 °C. Nos résultats informent sur le fait que PI, PIP et PIP₂ engendrent une dynamique similaire à pH 7,2.

f) Quantification de la composition isotrope des spectres de RMN du deutérium

Afin de relier les résultats obtenus par RMN du deutérium à ceux de RMN du phosphore, nous avons quantifié la composante isotrope contenue dans les spectres de RMN du deutérium. Le principe est le même que précédemment. Dans un premier temps, nous avons simulé une raie isotrope en RMN du deutérium. Nous avons ensuite soustrait cette raie isotrope au spectre expérimental. Dans un dernier temps, nous avons intégré le spectre expérimental (contenant donc la contribution isotrope et lamellaire) et le spectre soustrait (ne contenant plus que la composante lamellaire). L'aire des spectres étant proportionnelle à la quantité de lipides considérés, l'intégration nous permet de déterminer la quantité de lipides contenue dans chaque phase. Ceci a été effectué pour toutes les conditions étudiées en RMN du deutérium. Le tableau III-7 regroupe les données obtenues à partir de la RMN du deutérium et rappelle celles obtenues à partir de la RMN du phosphore.

Pour PI, PIP et PIP₂, nous avons constaté par RMN du deutérium que le pourcentage de composante isotrope augmente avec l'élévation de la température pour les deux pH étudiés. La même tendance avait été observée par la RMN du phosphore. Il est à noter que l'estimation de la composante isotrope par la RMN du deutérium donne des valeurs moins importantes que celles déterminées par RMN du phosphore, notamment à 40 °C. Ceci rend

compliqué l'étude de l'effet du pH à cette température. A -5 °C et à 10 °C, l'effet du pH, que nous avons observé en RMN du phosphore, est confirmé en RMN du deutérium.

	% iso à -5 °C		% iso à 10 °C		% iso à 40 °C	
	RMN ² H	RMN ³¹ P	RMN ² H	RMN ³¹ P	RMN ² H	RMN ³¹ P
POPC	0±5	0±5	0±5	0±5	0±5	0±5
PI pH 4,8	0±5	0±5	3±5	0±5	12±5	11±5
PI pH 7,2	0±5	4±5	0±5	11±5	20±5	30±5
PIP pH 4,8	5±5	0±5	5±5	3±5	30±5	35±5
PIP pH 7,2	5±5	0±5	5±5	3±5	25±5	20±5
PIP ₂ pH 4,8	10±5	0±5	20±5	15±5	30±5	50±5
PIP ₂ pH 7,2	10±5	0±5	15±5	15±5	25±5	45±5

Tableau III-7 Tableau comparatif des pourcentages de la composante isotrope présente dans les dispersions de PPIs, déterminés à partir des spectres de RMN du deutérium et à partir des spectres de RMN du phosphore. La composante isotrope est déterminée par soustraction d'une raie isotrope au spectre expérimental (voir texte).

Nous venons de voir que la comparaison des résultats obtenus par RMN du phosphore et par RMN du deutérium montre des tendances similaires mais aussi quelques divergences notamment à 40 °C. Il est important de rappeler que les membranes que nous avons utilisées pour la RMN du deutérium comportaient un faible pourcentage de POPC deutéré. Même en faible proportion, celui-ci pourrait stabiliser la phase lamellaire et donc abaisser le pourcentage de composante isotrope.

III.5 Etude par cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de phosphoinositides

La RMN du phosphore nous a permis de déterminer que les dispersions aqueuses de PI, PIP, PIP₂ et PIP₃ sont principalement constituées d'un mélange de phase lamellaire et de phase isotrope (au sens de la RMN). Nous avons également constaté que la proportion de ce mélange varie avec le pH et la température. Cependant, ces techniques ne nous permettent pas de déterminer précisément la morphologie des objets. En effet, la phase lamellaire pourrait être constituée de MLVs, de GUVs ou encore de LUVs. Concernant la phase isotrope, nous pourrions avoir des micelles, des SUVs ou encore une phase cubique. Il est donc apparu intéressant de nous tourner vers une technique d'analyse permettant d'obtenir ce type

d'informations. Nous avons choisi la cryomicroscopie électronique à transmission, technique permettant d'obtenir des images de nos échantillons.

Nous avons étudié par cryomicroscopie électronique des dispersions aqueuses de PI à pH 7,2, des dispersions de PIP et de PIP₂ à pH 4,8 et pH 7,2. Il est important de mentionner que ces images ne servent, dans notre cas, qu'à visualiser les objets formés et non à les quantifier. En effet, certains problèmes de reproductibilité ont été rencontrés concernant la proportion des objets observés. Il n'a donc pas été possible de faire une étude statistique sur nos échantillons (c'est-à-dire une quantification de ces objets que nous aurions pu corréler avec les données RMN).

III.5.1 Dispersions aqueuses de PI à pH 7,2

La figure III-14 représente les clichés obtenus pour une dispersion aqueuse de PI à température ambiante (20 °C).

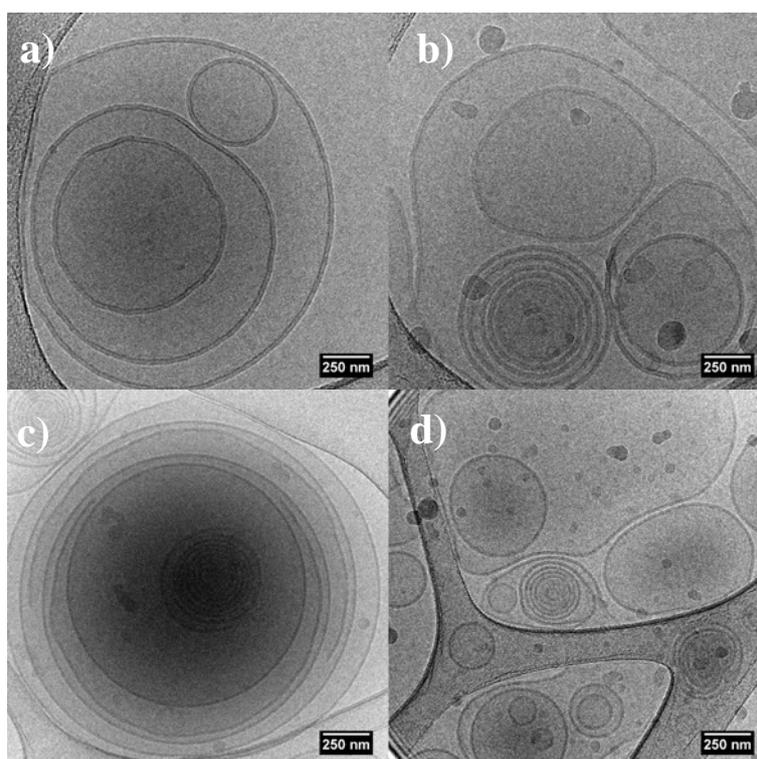


Figure III-14 Clichés de cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de PI à pH 7,2. PI est hydraté à 95% dans un tampon MOPS à pH 7,2. La barre d'échelle est indiquée sur les clichés. Température avant trempe : température ambiante soit approximativement 20 °C. Barre d'échelle : 250 nm.

Nous avons observé essentiellement la présence de liposomes de taille conséquente. En effet, nous avons mesuré des tailles allant de 0,5 μm à 2,5 μm . Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus par spectroscopie de RMN du phosphore. En effet, entre 10 °C et 20 °C, nous avons estimé un pourcentage de phase isotrope compris entre 11 \pm 5 et 23 \pm 5 % : la phase lamellaire étant alors majoritaire. Nous avons observé quelques LUVs d'environ

100 nm. Nous pouvons donc conclure que PI à pH 7,2 forme essentiellement des vésicules multilamellaires de plusieurs microns.

III.5.2 Dispersions aqueuses de PIP à pH 4,8 et à pH 7,2

a) Etude à pH 4,8

Les figures III-15 et III-16 représentent les clichés obtenus pour une dispersion de PIP à pH 4,8. Plusieurs types d'objets ont été constatés.

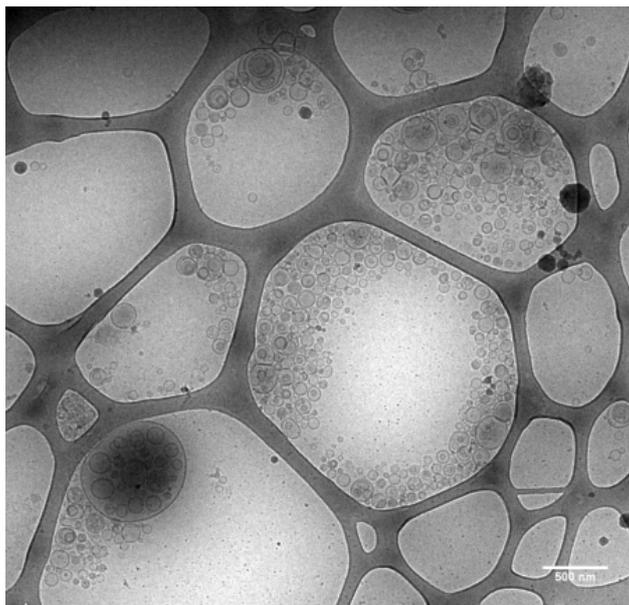


Figure III-15 Clichés de cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de PIP à pH 4,8. PIP est hydraté à 95% dans un tampon acétate à pH 4,8. Température avant cryogénéisation : environ 20 °C (température ambiante). La barre d'échelle est indiquée sur les clichés.

La figure III-15 montre un cliché à champ large représentatif de ce qui a été observé majoritairement pour cette condition. Nous constatons des MLVs de taille hétérogène et un grand nombre de vésicules unilamellaires telles que des LUVs et de SUVs. Les vésicules unilamellaires semblent majoritaires sur les vésicules multilamellaires. De plus, il est important de noter que très peu de MLVs de diamètres supérieurs à 500 nm ont été observées, indiquant une diminution globale de la taille des MLVs comparé à PI.

La figure III-16 montre des clichés du même échantillon avec un grossissement plus fort. Nous avons alors pu analyser plus précisément les objets de petite taille. Des vésicules unilamellaires de taille hétérogène allant de 50 nm à 200 nm ont été observées (Figure III-16 a-b-c-e-f-g). Nous avons également constaté quelques vésicules multilamellaires de petite taille (de 50 nm à 100 nm de diamètre, figure III-16 c-e) ainsi que de taille intermédiaire (clichés c et d de la figure III-16). Un réseau de fibres d'épaisseur de l'ordre de 6 nm a été observé.

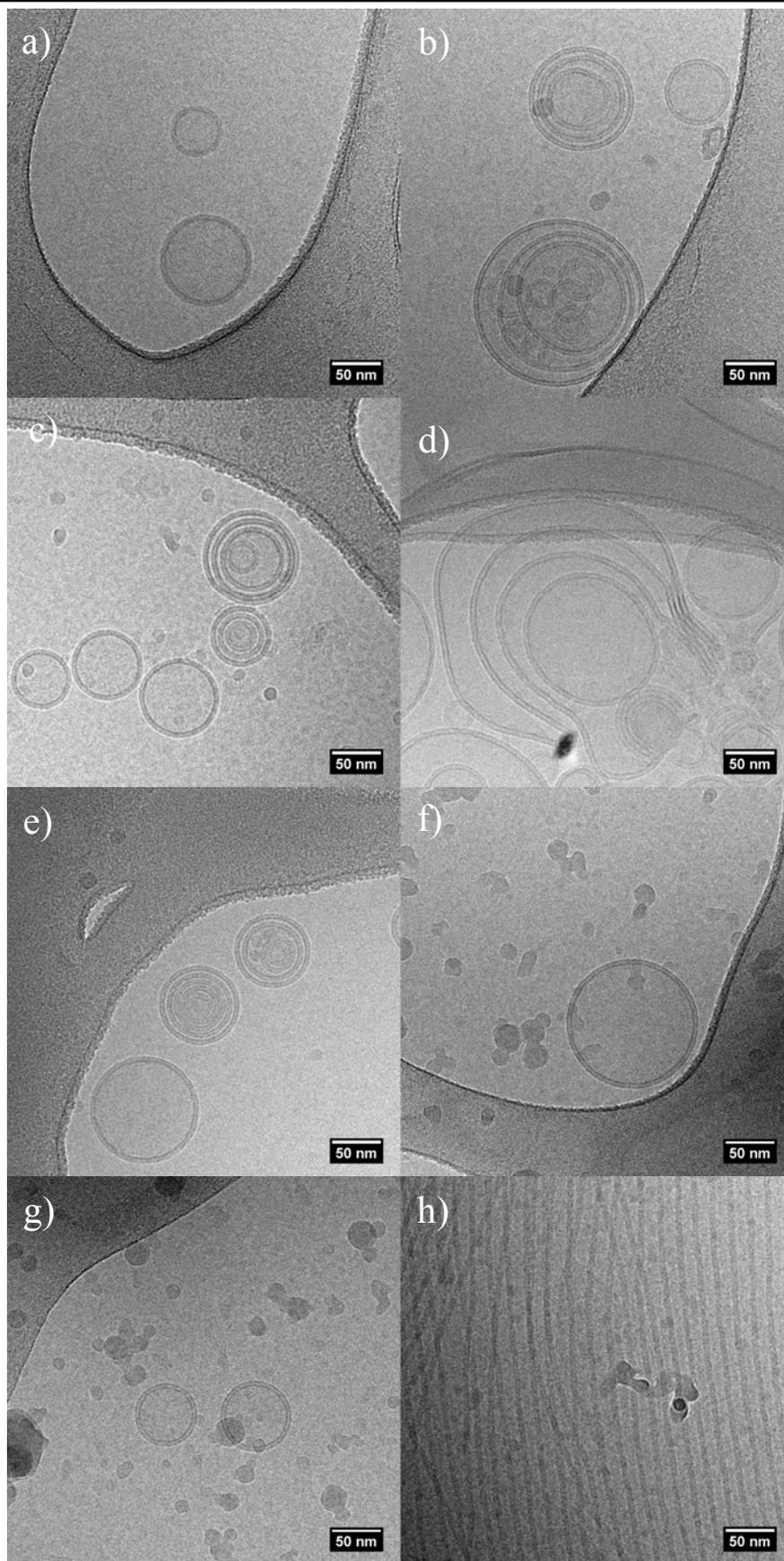


Figure III-16 Clichés de cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de PIP à pH 4,8. PIP est hydraté à 95% dans un tampon acétate à pH 4,8. La barre d'échelle est indiquée sur les clichés. Température avant cryogénéisation : environ 20 °C (température ambiante). a, d et g) SUVs de diamètre inférieur à 100 nm. b) MLVs de taille intermédiaire ainsi qu'une vésicule unilamellaire. c et e) Mélange de SUVs et de MLVs de petite taille. d) MLVs. e) LUVs. h) réseau de fibres de largeur d'environ 6 nm.

Ce résultat est toutefois à prendre avec précaution car sur trois échantillons observés, nous n'avons obtenu ce type d'objet qu'une seule fois. Il serait donc possible que ces objets soient une propriété de PIP mais aussi qu'ils proviennent d'un problème au niveau de l'échantillon. Ceci reste à confirmer.

Nos observations indiquent que PIP aurait tendance à former majoritairement des objets unilamellaires. De plus, les objets sont généralement de taille plus petite que ceux observés pour PI. En RMN du phosphore, nous avons déterminé qu'à 20 °C ce lipide avait tendance à former majoritairement une phase lamellaire ($10\pm 5\%$ de phase isotrope). Ces clichés de microscopie nous permettent d'avancer que le signal RMN caractérisant une composante lamellaire résulterait de MLVs et de LUVs présentant des tailles supérieures à 100 nm et que le signal caractérisant la composante isotrope résulterait des vésicules de tailles inférieures à 100 nm.

a) Etude à pH 7,2

Nous avons ensuite étudié des dispersions de PIP à pH 7,2 à 20 °C.

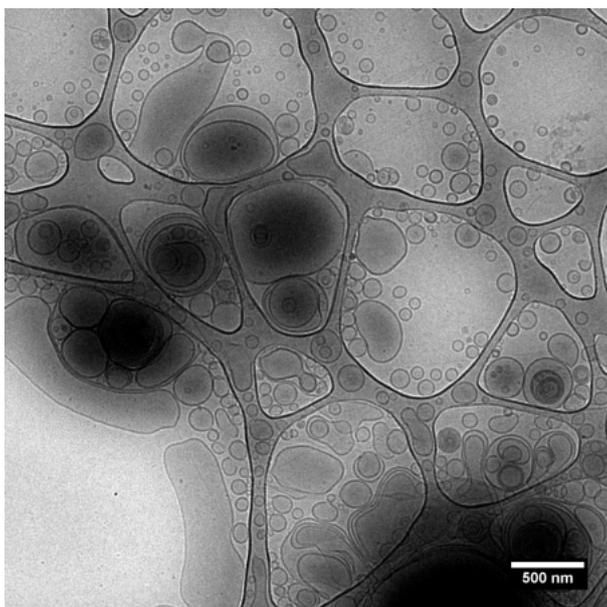


Figure III-17 Clichés de cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de PIP à pH 7,2. PIP est hydraté à 95% dans un tampon MOPS à pH 7,2. La barre d'échelle est indiquée sur les clichés. Température avant cryogénéisation : 20°C.

La figure III-17 montre une partie de la grille observée à faible grossissement montrant une vue d'ensemble de l'échantillon. Nous constatons que nous sommes en présence d'un mélange d'objets hétérogènes tant par la forme que par la taille. Nous observons des vésicules multilamellaires de diamètres importants (allant jusqu'à plusieurs microns) et des vésicules unilamellaires de taille très hétérogène. En effet, la taille de ces vésicules unilamellaires s'étend du micron à une cinquantaine de nanomètres.

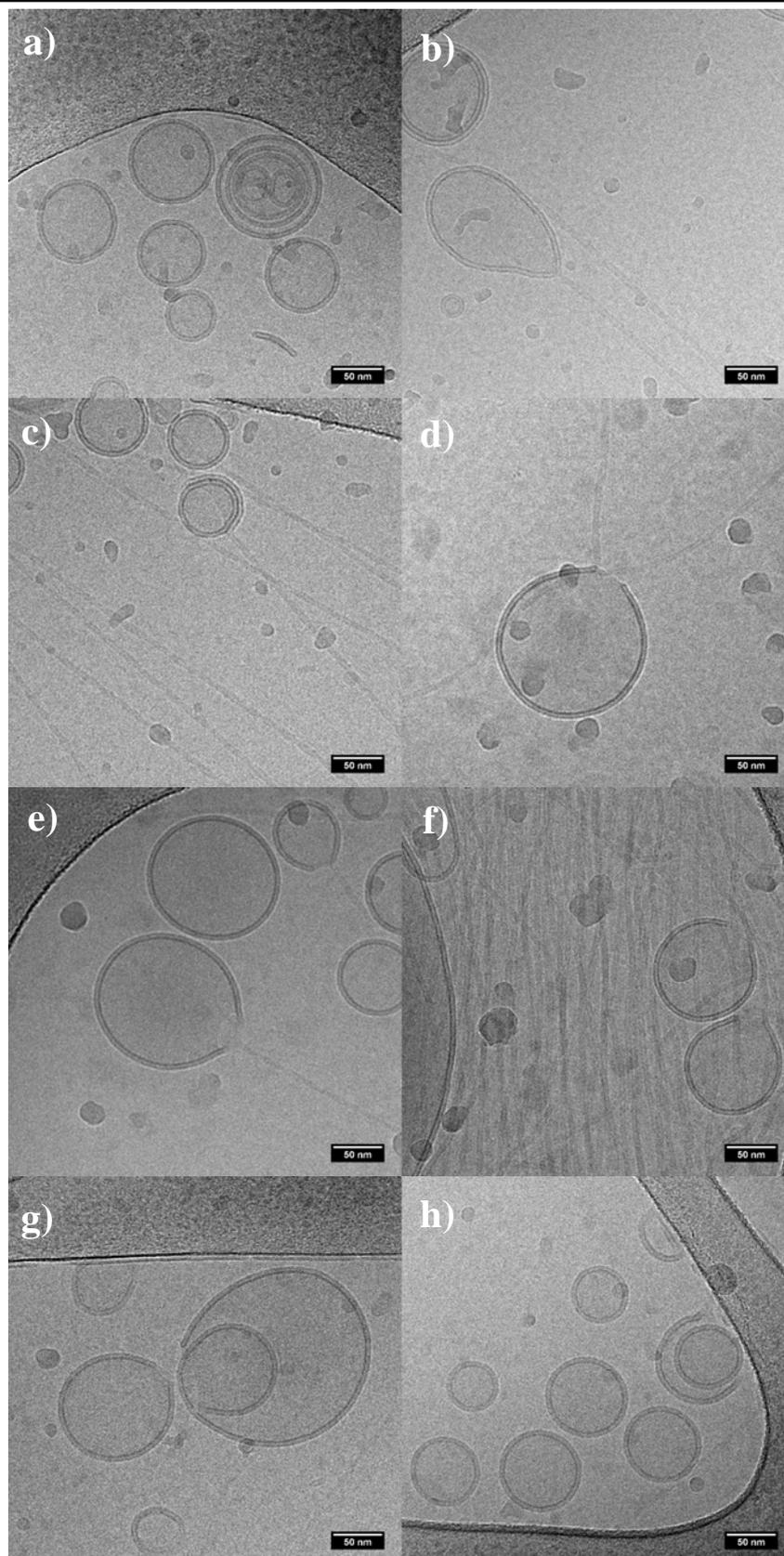


Figure III-18 Clichés de cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de PIP à pH 7,2. PIP est hydraté à 95% dans un tampon MOPS à pH 7,2. La barre d'échelle est de 50 nm. La température avant cryogénéisation est de 20 °C. a) SUVs et MLVs de taille inférieure à 100 nm. b) vésicules présentant la forme d'un ballon de baudruche. c) Mélange de SUVs et de fibres d'épaisseur de ≈ 5 nm. d) vésicule présentant la forme d'un ballon de baudruche à deux tiges. e) Mélange de SUVs, LUVs, et d'une vésicule présentant la forme d'un ballon de baudruche. f) Mélange de fibres d'épaisseur de ≈ 5 nm et de vésicules présentant la forme d'un ballon de baudruche. Sur le coin gauche, nous devinons un large LUVs. g) Mélange de SUVs et de vésicules s'enroulant sur elle-même. h) mélange de SUVs.

Si nous comparons ce que nous observons à pH 7,2 avec ce que nous avons constaté précédemment à pH 4,8 pour ce même lipide PIP, la proportion d'objets de grande taille semble plus importante à pH 7,2.

La figure III-18 montre une sélection d'objets observés avec un grossissement plus important. Des LUVs, des SUVs, des petits MLVs ainsi que des fibres ont été observés. Sur les clichés III-17 b, d, e et g, nous constatons des LUVs de taille moyenne aux environs de 100-150 nm. Sur les clichés a-e-g-h, nous avons des SUVs dont la taille varie de 50 nm à 100 nm. Des petites vésicules multilamellaires de l'ordre de 100 nm ont également observées (Figure III-18 a-h). Nous avons également constaté un réseau de fibres, qui n'apparaissent pas sur la figure III-17 en raison du faible grossissement. Ces structures rappellent des micelles tubulaires (Vinson et al., 1989 ; Walter et al., 1991 ; Lin, 1996). Contrairement à pH 4,8, ces micelles cylindriques ont été observées pour plusieurs échantillons (Figure III-18 b-c-d-e- et f). Ceci serait donc une propriété de ce lipide à ce pH. Si nous regardons les vésicules plus en détails, nous constatons qu'un certain nombre d'entre elles sont ouvertes et qu'une fibre part de ces portions de membranes ouvertes (forme de ballon de baudruche, figure III-18 b-c-d). Sur le cliché a, nous observons également dans le coin droit en bas un morceau de bicouche. Ceci proviendrait de l'ouverture d'une vésicule. Ces structures sont généralement observées lors d'une transition vésicules/micelles (Vinson et al., 1989 ; Walter et al., 1991). Sur le cliché g, nous observons également un objet particulier. Si nous examinons l'objet le plus gros de cette image, nous constatons que cette vésicule est ouverte. En effet, la bicouche semble s'enrouler sur elle-même et possède deux extrémités bien distinctes.

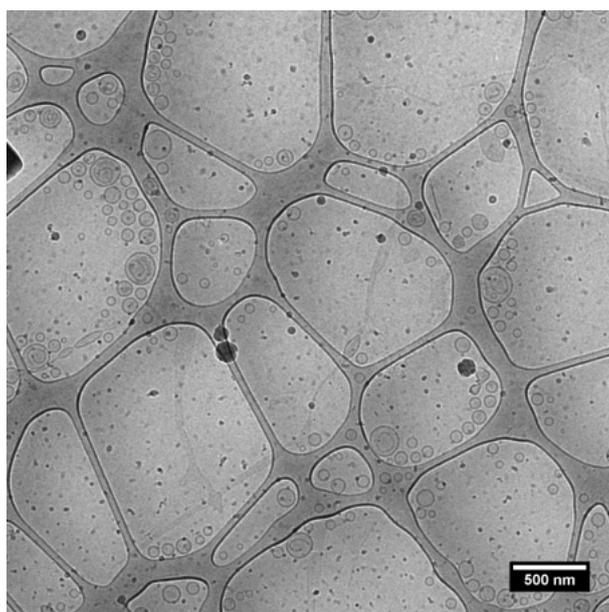


Figure III-19 Clichés de cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de PIP₂ à pH 4,8. PIP₂ est hydraté à 95% dans un tampon MOPS à pH 7,2. La barre d'échelle est indiquée sur les clichés. Température de cryogénéisation : 20 °C.

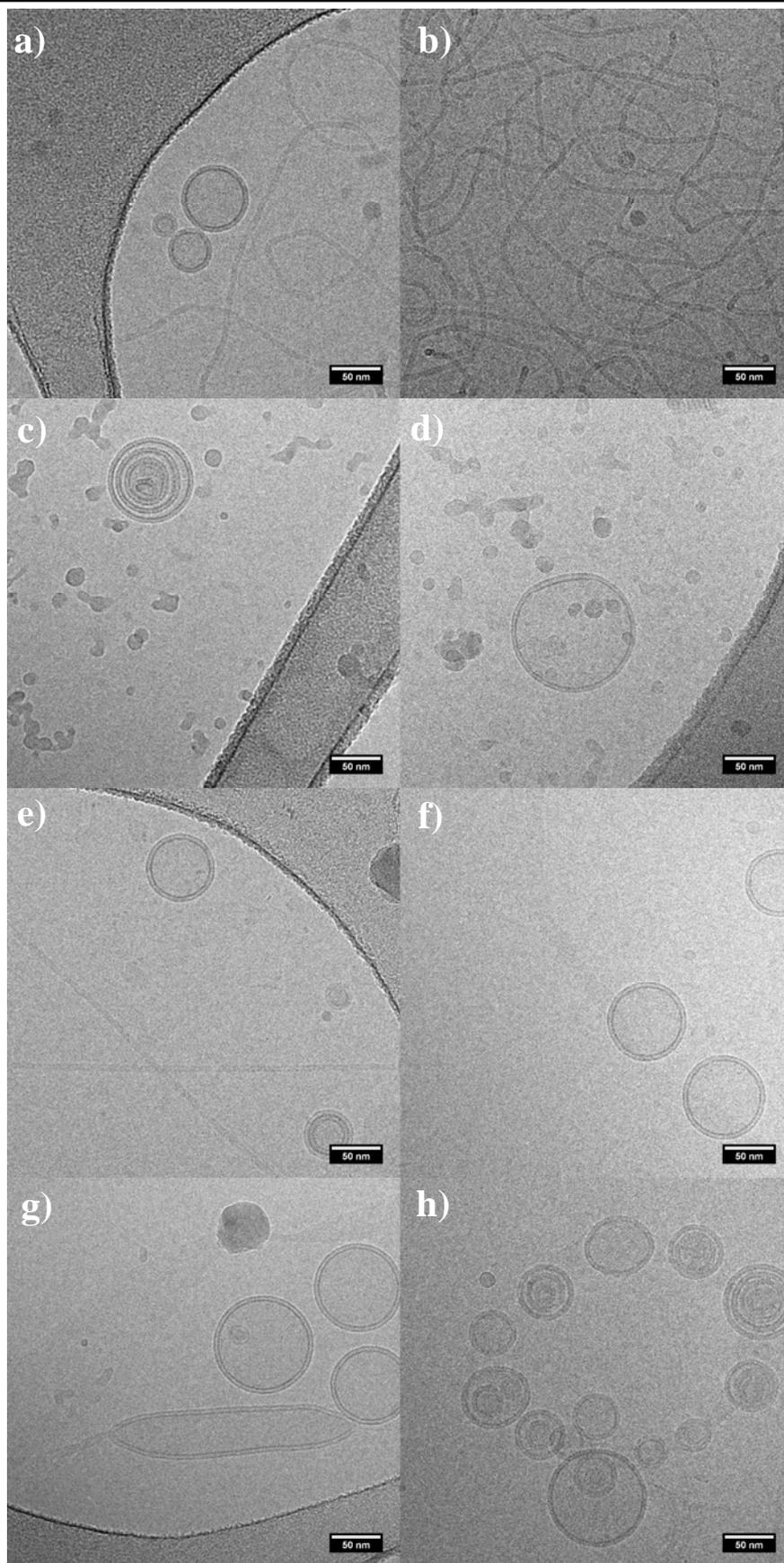


Figure III-20 Clichés de cryomicroscopie électronique de dispersions aqueuses de PIP₂ à pH 4,8. PIP₂ est hydraté à 95% dans un tampon MOPS à pH 7,2. La barre d'échelle est de 50nm. La température de cryogénération est de 20 °C. a) Mélange de SUVs et de micelles tubulaires. b) micelles tubulaires. c) MLV d'environ 50 nm. d) LUV d'environ 100nm. e) nous observons un SUV, des micelles cylindriques et un MLV de petite taille. f) SUVs. g) LUVs de diamètre inférieur à 100nm et vésicules allongées ouvertes. h) mélange de SUV et MLV de taille inférieur à 100nm

III.5.3 Dispersions aqueuses de PIP₂ à pH 4,8 et à pH 7,2

a) Etude à pH 4,8

Les figures III-19 et III-20 montrent des clichés obtenus pour une dispersion aqueuse de PIP₂ à pH 4,8 à 20 °C. Un mélange de LUVs, de SUVs et quelques MLVs a été observé à faible grossissement (Figure III-19). La majorité des objets ont un diamètre plus petit que 300 nm. Ceci indique que PIP₂ posséderait la faculté de former des entités de plus petite taille que PI et PIP.

La figure III-20 montre des clichés du même échantillon avec un grossissement plus important. Nous avons observé des SUVs de diamètre compris entre 40 nm et 100 nm (Figure III-20 a-e-f-g- et h), des LUVs d'environ 100 nm (Figure III-20 d) et des MLVs d'un diamètre de l'ordre de 80 nm (Figure III-20 c et h). Sur le cliché g, nous pouvons voir une vésicule unilamellaire allongée. Ces structures sont en général associées à des structures intermédiaires entre petites et grandes vésicules (Vinson et al., 1989). Nous avons également observé un réseau de micelles cylindriques (figure III-20 a-b- et g).

b) Etude à pH 7,2

Les figures III-21 et III-22 représentent les clichés obtenus pour des dispersions aqueuses de PIP₂ à pH 7,2 pour une température de 20 °C.

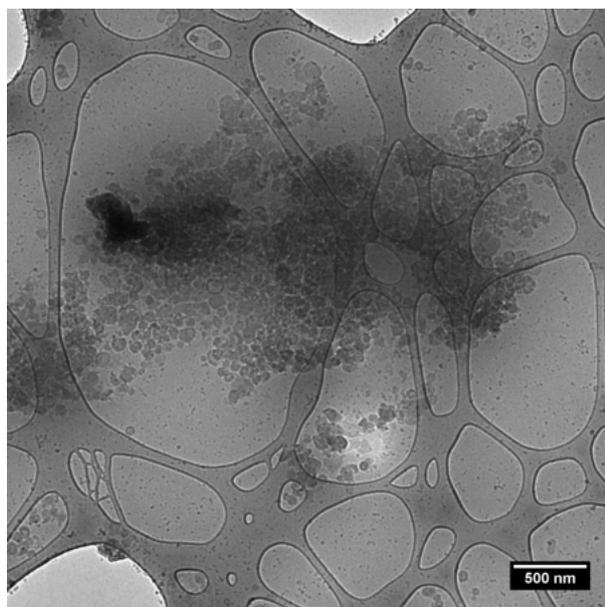


Figure III-21 Clichés de cryomicroscopie de dispersions aqueuses de PIP₂ à pH 7,2. PIP₂ est hydraté à 95% dans un tampon MOPS à pH 7,2. La barre d'échelle est indiquée sur les clichés. Température de cryofixation : 20 °C.

La figure III-21 correspond à un faible grossissement. Nous pouvons constater sur cette image de nombreux agrégats.

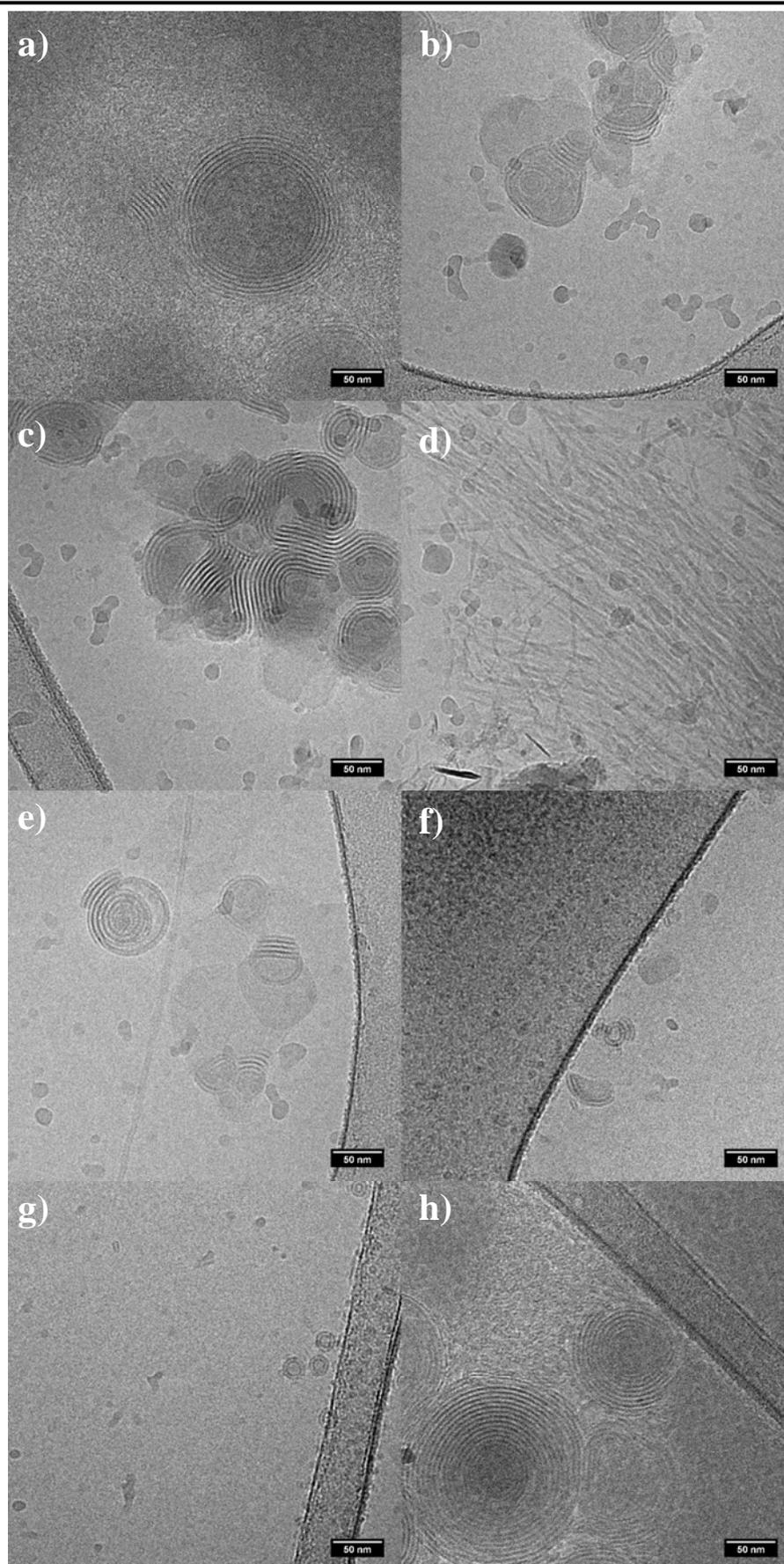


Figure III-22 Clichés de cryomicroscopie de dispersions aqueuses de PIP_2 à pH 7,2. PIP_2 est hydraté à 95% dans un tampon MOPS à pH 7,2. La barre d'échelle est de 50 nm. La température de cryogénération est de 20 °C. a,b,c) structure faisant penser à un agrégat de bicouches (voir texte). d) micelles tubulaires. e) morceaux de bicouches accolées sur des liposomes. Au milieu de l'image nous constatons également une micelle cylindrique. f) SUVs et vésicule ouverte. g) SUV. h) structure faisant penser à un agrégat de bicouches.

A ce grossissement, il est impossible de mieux les caractériser. Nous pouvons néanmoins mentionner que ces agrégats présentent une structure différente de ce que nous observé précédemment, pour les autres conditions.

Avec un grossissement plus fort, nous avons constaté que ces objets présentent une structure en oignon et un diamètre pouvant atteindre 200 nm (figure III-22 a-b-c-e et h). Cependant, ces entités sont différentes de celles précédemment observés. En effet, la distance entre les bicouches apparaît régulière et il semblerait que très peu d'eau soit contenue entre les bicouches (épaisseur de la phase aqueuse entre les bicouches non visible à ce grossissement), donnant l'impression de bicouches accolées les unes aux autres. Des structures similaires ont déjà été observées et assimilées à une structure de type hexagonale (Siegel et Epan, 1997) ou à une structure cochléate (Papahadjopoulos et al., 1975 ; Laroche et al., 1991). Ceci sera discuté ultérieurement. Le cliché e montre des morceaux de bicouches accolés les unes aux autres et à des liposomes. Ces bouts de bicouches proviendraient de l'ouverture des vésicules. Nous avons également observé des micelles tubulaires (Figure III-22 d). Enfin, Des vésicules unilamellaires de très petite taille ont été constatées. En effet, elles ont un diamètre de l'ordre de 18-25 nm (Figure III-22 f-g).

III.6 Discussion

Du fait d'un fort enrichissement en PPIs dans les membranes précurseurs de l'enveloppe nucléaire, MV1 et NERs, ces lipides sont supposés essentiels à la formation de l'enveloppe nucléaire. Leur forte concentration laisse envisager un rôle au niveau de la structure et de la dynamique membranaire. Cependant, à ce jour, peu d'études à ce sujet ont été menées sur les PPIs. Le but de ce chapitre a donc été d'apporter de nouvelles informations quant à leurs propriétés structurales et de dynamiques. Nous avons montré que la morphologie (polymorphisme) des dispersions aqueuses de PPIs dépendait de la température et du pH et que la dynamique et l'orientation locale des chaînes et des têtes polaires y étaient peu sensibles (Les tableaux III-8 et III-9 et la figure III-23 regroupent les principaux résultats dont nous aurons besoin pour la discussion). Ces deux points vont faire l'objet de la discussion et une implication biologique de ces résultats sera mise en avant.

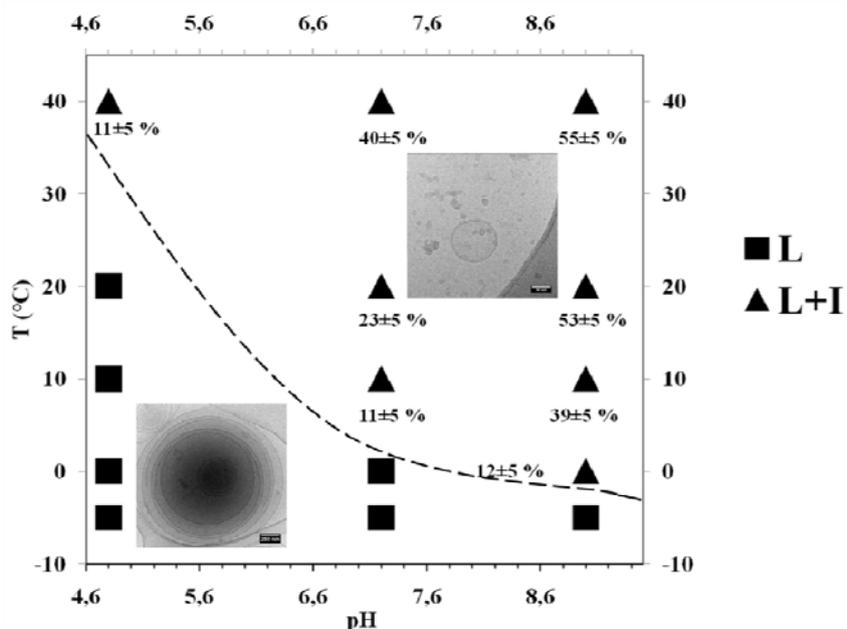
	PI (10 °C)			PIP (10 °C)			PIP ₂ (0 °C)		
pH	4,8	7,2	9	4,8	7,2	9	4,8	7,2	9
Charge	-1	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-4	-5
2S _{CD} plateau	0,38±0,02	0,42±0,02	nd	0,40±0,02	0,42±0,02	nd	0,38±0,02	0,40±0,02	nd

Tableau III-8 Comparaison des paramètres d'ordre de la région « plateau » pour des membranes riches en PI, PIP et PIP₂ en fonction du pH. nd : non déterminé. La même tendance a été observée au niveau de la région des méthyles.

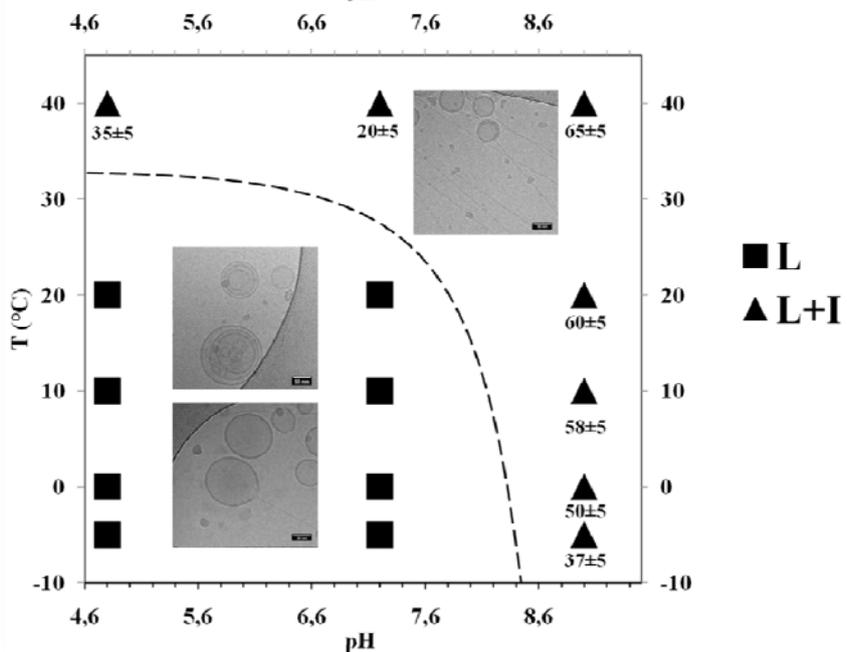
	PI (10 °C)			PIP (10 °C)			PIP ₂ (0 °C)		
pH	4,8	7,2	9	4,8	7,2	9	4,8	7,2	9
Charge	-1	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-4	-5
$\Delta\sigma$ (ppm) Phosphodiester	-58±2	-56±2	-62±2	-59±2	-59±2	-40±10	nd	-60±5	nd
$\Delta\sigma$ (ppm) Phospho- monoester P4	-	-	-	-12±2	-14±2	-8±5	nd	-14±2	nd
$\Delta\sigma$ (ppm) Phospho- monoester P5	-	-	-	-	-	-	nd	-3±2	nd

Tableau III-9 Comparaison des anisotropies de déplacement chimique de PI, PIP et PIP₂ en fonction du pH. nd : non déterminé.

A)



B)



C)

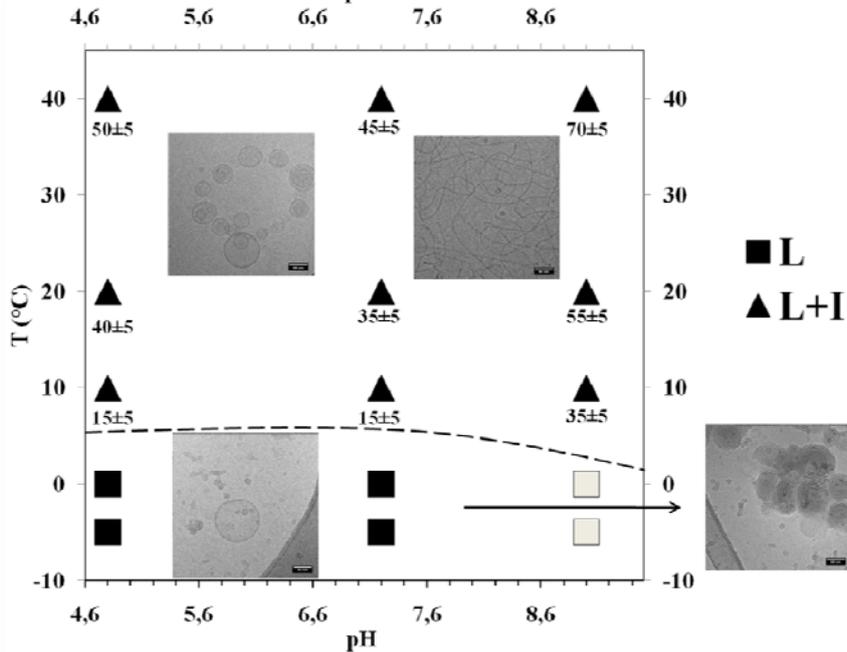


Figure III-23 Diagrammes de phase de dispersions aqueuses de PI, PIP et PIP₂ en fonction de la température et du pH. Nous avons deux phases sur ce diagramme : une phase lamellaire (carré) et une phase composée d'un mélange de phase isotrope et de phase lamellaire (triangle). Les pourcentages de phase isotrope dans le mélange sont indiqués sur le diagramme. La délimitation des différentes régions est donnée à titre indicatif. Sauf indication contraire, la barre d'échelle des images présentées est de 50 nm. **A) Diagramme de phase de PI.** La zone lamellaire est essentiellement constituée de vésicules multilamellaires de grande taille (barre d'échelle sur l'image 500 nm). La composante isotrope est majoritairement constituée de LUVs de taille d'environ 100 nm. **B) Diagramme de phase de PIP.** La zone lamellaire est essentiellement constituée de vésicules multilamellaires et unilamellaires de taille intermédiaire. La composante isotrope est majoritairement constituée de SUVs. Nous avons également constaté l'apparition de micelles cylindriques. **C) Diagramme de phase de PIP₂.** La zone lamellaire est essentiellement constituée de vésicules unilamellaires de taille intermédiaire (un autre type d'objet a été observé, voir texte). La composante isotrope est majoritairement constituée de vésicules multilamellaires et de SUVs de très petite taille (< à 50 nm) et de micelles cylindriques.

III.6.1 Morphologies des membranes constituées de PPIs

Nos études sur les dispersions aqueuses de PI, de PI-4-P et de PI-4,5-P₂ par RMN des solides (sur les noyaux ³¹P et ²H) et par cryomicroscopie électronique ont permis d'élaborer des « diagrammes de phase » préliminaires de PI, de PIP et de PIP₂ en fonction de la température et du pH. Ces diagrammes sont présentés sur la figure III-23. Dans la gamme de températures et de pH étudiés, nous avons observé deux régions principales pour les trois lipides. La première est essentiellement constituée d'une phase lamellaire. La deuxième se trouve être un mélange de phase lamellaire et de « phase isotrope » au sens de la RMN. La délimitation de chaque zone est indiquée grossièrement sur la figure. Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'affiner la délimitation de ces régions.

Ces diagrammes révèlent pour ces trois lipides l'existence d'une « transition de phase » entre une phase lamellaire et un mélange de phase lamellaire et de phase isotrope dans la gamme de températures et de pH étudiés. Ce phénomène est quasi inexistant chez POPC. En effet, des études, dans la même gamme de températures et de pH, ne montrent pas ou très peu de formation de petits objets à réorientation isotrope rapide. Ceci indique que PI, PIP et PIP₂ induirait une courbure membranaire plus importante que POPC, dont la courbure membranaire est quasi nulle (Szule et al., 2002). La courbure membranaire traduit la capacité d'une membrane à se courber. Plus sa courbure est importante, plus elle aura tendance à former des objets de petite taille (Gruner et al., 1985). Ceci peut se comprendre à l'aide du concept de forme d'Israelachvili (Israelachvili et al., 1980).

La taille de la tête polaire des PPIs est plus importante que celle de PC en raison de la présence d'un cycle inositol (phosphorylé et chargé dans le cas de PIP et PIP₂). A chaîne lipidique équivalente, nous pouvons donc nous attendre à une courbure membranaire

(positive) plus importante pour une membrane constituée de PPIs que pour une membrane de PC. Dans notre cas, les PPIs présentent deux longues chaînes dont une possédant quatre insaturations (chaîne majoritaire : 18-0 :20-4). Ceci a pour conséquence d'augmenter de manière significative la taille de la section hydrophobe des PPIs considérés et donc d'atténuer la différence de taille entre la tête polaire et la section hydrophobe. Néanmoins, nos résultats indiquent que même avec une section hydrophobe plus importante que POPC, ces lipides engendrent une courbure supérieure à POPC.

Nous avons également constaté que la taille des objets formés par ces lipides diminue de PI à PIP₂ (Figure III-23). PI forme essentiellement des MLVs de grande taille (> 1 µm) à bas pH. A pH élevé, nous avons constaté l'apparition de LUVs d'environ 100 nm. PIP passe de son côté d'un mélange de MLVs et de LUVs de taille intermédiaire (< 1 µm) à un mélange de LUVs ouverte de taille intermédiaire (composante lamellaires), de SUVs (< 100 nm) et de micelles cylindriques (composante isotrope). Des vésicules ouvertes ont déjà été observées et seraient caractéristiques d'une transition vésicules/micelles cylindrique (Vinson et al., 1989 ; Walter et al., 1991). Nous avons également vu que PIP formait plus de vésicules unilamellaires que PI. La composante lamellaire de PIP₂ est constituée essentiellement de LUVs (< 500 nm) et d'un nouveau type d'agrégats donnant l'impression de vésicules multilamellaires contenant très peu d'eau entre les bicouches et dont la structure (en spirale) rappelle celle des phases cochléates (Papahadjopoulos et al., 1975 ; Laroche et al., 1991). Le peu d'eau contenue entre les bicouches laisse supposer que celles-ci se trouvent très proches les unes des autres. Il serait intéressant de mieux caractériser ces agrégats. La composante isotrope de PIP₂ est essentiellement constituée de SUVs et de MLVs de petite taille (la majorité à ≈ 50 nm) ainsi que de micelles cylindriques.

Nos constatations indiquent que ces lipides possèdent une courbure spontanée positive et que cette propriété serait plus prononcée de PI à PIP₂. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de groupements phosphates ionisables sur les têtes polaires de PIP et de PIP₂. Les pK_a des phosphodiesteres des PPIs ainsi que des phosphomonoesters de PIP et PIP₂ (première ionisation pK_{a1}) sont estimés à 2,5-3 (Abramson et al., 1968 ; Van Paridon, 1986). PI porterait donc une charge globale de -1 sur toute la gamme de pH étudié. Le pK_{a2} du phosphomonoester de PIP étant estimé à 6,3 (Abramson et al., 1968 ; Van Paridon et al., 1986), une charge globale de -2 est attendue à pH 5 et de -3 entre pH 7,2 et pH 9. Les pK_{a2} des phosphomonoesters P4 et P5 sont estimés à 6,7 et à 7,7, respectivement (Abramson et al., 1968 ; Van Paridon et al., 1986). On attend alors une charge globale de -3 à pH 4,8, de -4 à pH 7,2 et enfin de -5 à pH 9. Ceci implique que la taille de la tête polaire et la charge

augmente de PI à PIP₂. De ce fait, PIP₂ présenterait une forme conique inversée plus prononcée que PIP et que PI et donc ceci expliquerait la capacité à induire une courbure membranaire positive plus prononcée de PI à PIP₂ (Israelachvili, 1980).

Nous avons néanmoins observé un effet complexe du pH sur la « transition de phase » entre la phase lamellaire et la phase isotrope. Pour PI, la température à laquelle on passe d'une phase lamellaire à isotrope diminue avec l'augmentation du pH (Figure III-23). Pour PIP, nous avons constaté que la température de transition de phase ne diminue qu'aux alentours de pH 7,5. Si nous comparons les températures de transition de phase de PI et PIP entre pH 4,8 et 7,2, nous constatons que la transition se fait à plus haute température pour PIP (Figure III-23). Il y aurait donc un phénomène de stabilisation de la phase lamellaire pour PIP contrebalançant l'effet d'augmentation de la taille de la tête polaire et de la charge de PIP. Pour PIP₂, la température de « transition de phase » semble constante entre pH 4,8 et pH 7,2 puis diminuerait légèrement. A pH 4,8, la température de « transition de phase » de PIP₂ a fortement diminué par rapport à PIP et PI, puis devient équivalente à celle de PI pour les pH plus élevés (Figure III-23). Nous observons de nouveau un phénomène de stabilisation de la phase lamellaire à pH élevé malgré une augmentation de la taille de la tête polaire et de la charge. Ce phénomène de stabilisation de la phase lamellaire observé pour PIP et PIP₂ apparaît tout d'abord surprenant. En effet PIP et PIP₂ étant fortement chargés, nous nous attendions à observer une augmentation de la composante isotrope résultant de l'augmentation de la répulsion électrostatique. Ce phénomène de stabilisation pourrait s'expliquer par la propension de ces lipides à former des liaisons hydrogène entre eux, comme nous l'avons mentionné lors de l'introduction. Des études ont montré que les PPIs se regroupaient préférentiellement en domaines dans une membrane de PC (DeWolf et al., 1999 ; Liepina et al., 2003 ; Redfern et Guericke, 2004 ; Redfern et Guericke, 2005 ; Hermelink et Brezensinski, 2008 ; Kooijman et al., 2009). Il a été proposé pour expliquer ce phénomène, une stabilisation des domaines par un réseau de liaisons hydrogène entre les PPIs qui contrebalanceraient localement la répulsion électrostatique entre ces lipides (Liepina et al., 2003 ; Redfern et Guericke, 2004 ; Redfern et Guericke, 2005 ; Levental et al., 2008a ; Levental et al., 2008a ; Kooijman et al., 2009). La formation de ces domaines serait dépendante du pH et plus prononcée à partir de pH 7 (autrement dit lorsque les PPIs sont fortement chargés) (Redfern et Guericke, 2004 ; Redfern et Guericke, 2005). De plus, les domaines formés de PIP et de PIP₂ seraient plus stables que ceux formés de PI, laissant supposer une plus forte stabilisation par liaisons hydrogène du fait de la présence des groupements phosphomonoester (Redfern et Guericke, 2004 ; Redfern et Guericke, 2005). La

même tendance est observée entre PIP₂ et PIP, à savoir une plus forte stabilisation pour PIP₂ (Redfern et Guericke, 2005).

A pH 7, la stabilisation de la phase lamellaire pour PIP, que nous avons constaté, s'expliquerait donc par un réseau de liaison hydrogène entre les PPIs et concorderait avec les observations de Redfern et Guericke (Redfern et Guericke, 2004). A pH 9, une déstabilisation de la phase lamellaire pour PIP a été observée par rapport à pH 7. A cette condition, la répulsion électrostatique deviendrait plus forte, laissant alors supposer que la densité de surface a augmenté (contrairement à ce qui a été observé par Redfern et Guericke à pH 9). On peut envisager qu'à pH 7,2, toutes les molécules de PIP ne sont pas déprotonnées (car proche du pKa₂ de PIP) tandis qu'à pH 9, elles le sont. Ceci induirait une augmentation de la densité de charge à la surface de la membrane à pH 9 comparée à pH 7,2. Cette augmentation de charge ramènerait le système dans un état tel que la répulsion électrostatique dominerait sur la stabilisation par les liaisons hydrogène, favorisant alors la formation de SUVs. Dans son étude, Redfern a étudié un mélange de PIP dans PC à 15/85 (Redfern et Guericke, 2004). La charge globale de surface membranaire est donc diluée par rapport à nos études. Par conséquent, malgré une augmentation de la charge avec l'élévation du pH, le système reste toujours dans un état où les liaisons hydrogène sont dominantes sur la répulsion électrostatique globale. Le même phénomène est observé pour PIP₂. En effet, nous avons constaté une stabilisation de la phase lamellaire à partir de pH 7,2. Ceci amène à penser, comme pour PIP, à une stabilisation de la phase lamellaire malgré une augmentation importante de la charge des lipides. Cette stabilisation semble encore plus forte pour PIP₂ que pour PIP à pH élevé, ce qui est en accord avec les précédentes observations (Redfern et Guericke, 2005). Il est important de mentionner que la formation des agrégats de type cochléate observés pour ce lipide à pH 7,2 pourraient résulter de la formation d'un réseau de liaisons hydrogène entre les différentes bicouches (résultant alors en une importante déshydratation entre les bicouches comme constatée par microscopie). Ceci pourrait également expliquer que certains clichés montrent des morceaux de bicouches venant s'accoler les uns aux autres ou sur des vésicules. La formation d'un réseau de liaisons Hydrogène entre bicouches reste bien évidemment une hypothèse et par conséquent nécessite d'être confirmée.

PIP₃ est un lipide extrêmement coûteux. Ceci nous a conduits à ne mener des études qu'à pH 7,2. Nous avons choisi ce pH car il est physiologiquement intéressant et donc nous pourrions coupler nos observations avec ce qui est observé en biologie. PIP₃ formerait majoritairement des objets de petite taille. En effet, les spectres de RMN du phosphore sont

dominés par une raie isotrope assez large pouvant caractériser une distribution de taille de SUVs dès -5 °C (Douliez et al., 1994 ; Trajka et al., 2000). PIP₃ aurait donc une capacité plus importante à former des petits objets que PI, PIP et PIP₂. Par analogie à ce que nous avons observé pour PI, PIP et PIP₂, nous pouvons supposer que PIP₃ présenterait une courbure membranaire plus importante que ces derniers du fait de la présence de trois groupements phosphates ionisables. A notre connaissance, aucun pKa pour PIP₃ n'a été mesuré. La charge globale a néanmoins été estimée à -5 à pH 7, lorsque PIP₃ est incorporé dans une membrane de DOPC (chaîne 18-1 :18-1) (Kooijman et al., 2009). Comme pour les autres PPIs, nous pouvons envisager que le système se trouve dans une sorte d'équilibre entre stabilisation par liaisons hydrogène et déstabilisation par répulsion électrostatique. En raison de la forte contribution isotrope des spectres, nous envisageons que la déstabilisation par répulsion électrostatique a repris le dessus dans ce système. Il serait néanmoins utile de confirmer cela de manière plus quantitative.

III.6.2 Dynamique des membranes riches en PPIs

Afin de pouvoir évaluer la dynamique des chaînes lipidiques dans les membranes de PI, nous avons introduit une quantité minimale de POPC_{d31} dans les dispersions aqueuses de PI. Cette quantité minimale à introduire avait été déterminée et optimisée au cours d'études précédentes afin d'avoir une quantité suffisante pour avoir un signal RMN correct mais surtout de ne pas perturber l'environnement natif des membranes étudiées (Garnier-Lhomme, 2007). Nos résultats ont montré que les paramètres d'ordre obtenus pour les membranes riches en PPIs étaient inférieurs à ceux obtenus pour POPC seul, traduisant ainsi une augmentation du désordre dans les membranes riches en PPIs. Les PPIs contiennent quatre insaturations sur une des chaînes d'acide gras (chaîne *sn2*) ce qui entraîneraient un désordre important dans la bicouche (Cevc, 1991). De plus comparé à POPC, la tête polaire de PPIs est plus importante en taille (présence d'un cycle inositol phosphorylés), ce qui peut avoir également un rôle non négligeable sur la dynamique des lipides dans la membrane (Larijani et Dufourc, 2006).

Si nous comparons la dynamique des chaînes, nous constatons que pour PI, PIP et PIP₂, il n'y a pas d'effets notables du pH. Ceci est illustré à 10 °C (température proche de la température physiologique des oursins) dans le tableau III-8. Or PI, PIP et PIP₂, respectivement, ne portent pas la même charge. Ceci signifie que dans ce cas l'augmentation de la taille de la tête polaire ainsi que la charge globale du lipide n'influencent pas la dynamique des chaînes lipidiques. Ceci pourrait de nouveau s'expliquer par l'existence d'un réseau de liaisons hydrogène entre les PPIs. Comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe

précédent, ce réseau de liaisons hydrogène compense sans doute l'effet de désordre qui serait produit par des molécules chargées. L'effet de charge et de la taille de la tête polaire conduit à libérer de l'espace pour que les chaînes se réorientent (désordre), alors que les liaisons hydrogène intermoléculaires rapprochent les têtes et diminuent donc l'espace (ordre).

Nous avons ensuite étudié la dynamique au niveau des têtes polaires des PPIs. Le tableau III-9 regroupe les anisotropies de déplacement chimique obtenues pour ces lipides en fonction du pH à 10 °C. Nous avons déterminé une anisotropie de déplacement chimique du phosphodiester des PPIs étudiées aux alentours de -60 ppm. Celle-ci est plus importante que l'anisotropie de PC (qui se situe entre -40 et -50 ppm en fonction de la température). Ceci se traduit par un changement de dynamique et/ou un changement d'orientation des têtes polaires. Nous avons déjà mentionné que les membranes riches en PPIs sont plus dynamiques que celles riches en PC. Cette différence de $\Delta\sigma$ proviendrait alors d'un changement d'orientation du phosphore. Ceci concorde avec le fait que les têtes polaires des PPIs s'orienteraient préférentiellement de manière perpendiculaire à la surface de la membrane (Hansbro et al., 1992 ; Bradshaw et al., 1997 ; Zhou et al., 1997 ; Bradshaw et al., 1999 ; Li et al., 2009 ; Luypan et al., 2010) (Figure III-24), tandis que les têtes polaires de PC s'orienteraient parallèlement à la surface de la membrane (Seelig, 1978). Ceci expliquerait également que les $\Delta\sigma$ des phosphodiesters de PI, PIP, PIP₂ soient équivalents.

Pour PIP et PIP₂, l'anisotropie de déplacement chimique du phosphomonoester en position P4 a été déterminé à -15 ± 5 ppm suivant la température et le pH, traduisant une dynamique et une orientation similaire de ce phosphore dans PIP et PIP₂. Nous constatons alors que l'anisotropie de ce phosphore P4 est plus faible que celle du phosphodiester. Ceci s'expliquerait par une orientation différente mais aussi par une dynamique plus rapide de ce phosphore comparé au phosphodiester. Ces phosphores ne se situent pas au même endroit du cycle inositol et donc un changement d'orientation est attendu (Figure III-24). De plus, le phosphodiester se trouve à l'interface hydrophile/hydrophobe de la membrane (où la dynamique y est plus restreinte) tandis que le phosphomonoester se situe au niveau de la partie hydrophile et a donc plus de degrés de liberté. Le phosphomonoester P5 de PIP₂ présente un $\Delta\sigma$ compris entre -7 ± 3 et -3 ± 2 ppm. Ce changement ne peut être attribué à un changement de dynamique étant donné que ces phosphores sont tous les deux portés par le cycle inositol dont la dynamique est supposé constante à une température et une hydratation données. Ceci traduit donc un changement d'orientation du phosphore P5 par rapport au phosphore P4.

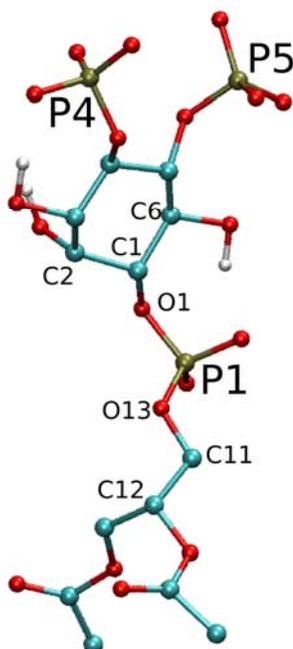


Figure III-24 Orientation de la tête polaire de PIP₂ dans une membrane de DPPC obtenue par dynamique moléculaire (Luypan et al., 2010). Les carbones sont présentés en bleu, les oxygènes en rouge et les phosphores en gris.

Le pH semble peu influencer sur les anisotropies de déplacement chimique de PI, PIP et PIP₂ entre pH 4,8 et pH 7,2 (nous ne pouvons discuter des résultats à pH 9 pour PIP et PIP₂ car nous n'avons pas pu mesurer tous les $\Delta\sigma$). Ceci signifie que l'augmentation de la charge n'influerait pas de manière significative sur l'orientation et sur la dynamique des têtes polaires de PPIs. Ceci pourrait s'expliquer, comme pour les résultats de RMN du deutérium, par l'existence d'un réseau de liaisons hydrogène entre les PPIs contrebalançant la répulsion électrostatique et par conséquent l'augmentation de la dynamique liée à celle-ci.

III.6.3 Implications biologiques

Notre travail a montré que les PPIs possèderaient une courbure spontanée positive. Cette tendance serait fortement prononcée pour PIP₂ et PIP₃. De tels lipides comme les lysolipides ont la faculté d'induire des structures non-lamellaires à forte courbure positive (Wickner et Schekman, 2008). Ce point apparaît très intéressant puisque les processus de fusion dépendent fortement de la courbure de la membrane. Plus précisément, la modification de la courbure spontanée d'une membrane joue sur l'énergie de formation des « stalks » et des pores de fusion (intermédiaires de fusion) et donc contrôle leurs formations (Zimmerberg et al., 1993 ; Chernomordik et al., 1995 ; Chernomordik, 1996 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Frolov and Zimmerberg, 2010). Nous avons vu lors de l'introduction que les lipides à courbure positive facilitent les processus de fusion en stabilisant l'ouverture du pore de fusion lorsqu'ils se trouvent dans les monocouches distales des membranes devant fusionner. Nous

pouvons donc supposer que la présence de PPIs (et plus particulièrement de PIP₂ et PIP₃) dans les membranes MV1 et NERs induirait une courbure membranaire positive à celles-ci, pouvant favoriser les mécanismes de fusion membranaire en facilitant l'ouverture du pore de fusion.

Nous avons également vu que les PPIs engendrent une fluidité membranaire très importante quel que soit le PPI considéré (pas de différences entre les PPIs). Cet effet de fluidification pourrait s'avérer très intéressant dans les processus de fusion membranaire lors de la formation de l'enveloppe nucléaire. En effet, les mécanismes de fusion membranaire impliquent d'importantes déformations de la membrane (voir chapitre I) (Chernomordik, 1996 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). Une membrane fluide présente plus de facilité qu'une membrane rigide à se déformer. Ceci se comprend aisément par le fait que la dynamique de la membrane affecte l'épaisseur de celle-ci (Douliez et al., 1995 ; Douliez et al., 1996). Plus une membrane est fluide, plus son épaisseur est faible. L'épaisseur de la membrane est, quant à elle, reliée à l'élasticité de courbure membranaire, paramètre permettant de quantifier la résistance de la membrane aux déformations (Helfrich, 1974 ; Méléard et al., 1997 ; Rawicz et al., 2000 ; Marsh, 2006). Plus une membrane est fine, plus elle a la capacité à se déformer et par conséquent à former les intermédiaires de fusion. Une membrane enrichie en PPIs comme les MV1 ou les NERs présenterait, du fait de sa grande fluidité, une plus forte capacité à subir des processus de fusion que des membranes de type « classique » moins fluide.

III.7 Conclusion

Nous avons étudié, par RMN des solides (³¹P et ²H) et par cryomicroscopie électronique, la structure et la dynamique de dispersions aqueuses de PPIs insaturés en fonction de la température et du pH. Nos résultats ont indiqué que les PPIs induisent une courbure de membrane favorisant la formation de SUVs et de micelles. De plus, nous avons observé que ces lipides induisent une forte fluidité membranaire. Sachant que ces deux paramètres peuvent contribuer de manière favorable à la fusion, nous pouvons envisager qu'un tel enrichissement en PPIs dans les membranes MV1 et NERs permettrait d'augmenter la propension de ces membranes à fusionner. Il apparaît essentiel de valider cette hypothèse en modélisant des membranes représentatives des MV1 et des NERs. Ceci constituera l'objet des deux prochains chapitres.

IV. Etude des vésicules membranaires MV1, riches en phosphoinositides, essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire

IV.1 Introduction

La formation *in vitro* de l'enveloppe nucléaire nécessite la présence de trois populations de membranes différentes : NERs, MV1 et MV2. MV1, vésicules membranaires issues du cytoplasme de l'œuf fécondé et NERs, membrane retenue à chaque pôle du noyau de spermatozoïde, ont une composition lipidique tout à fait particulière. En effet, ces membranes sont fortement enrichies en phosphoinositides (Figure IV-1), phospholipides se trouvant le plus souvent en faible quantité dans les membranes cellulaires (Byrne et al., 2007, Garnier-Lhomme et al., 2009). Ces lipides ont largement été étudiés pour leur rôle en signalisation cellulaire, mais leurs propriétés physico-chimiques (notamment l'influence qu'ils peuvent avoir sur les propriétés membranes) sont encore peu étudiées.

Le but de ce chapitre est de caractériser l'effet des PPIs sur les propriétés structurales et dynamiques des vésicules MV1. Pour cela, nous avons travaillé avec des modèles membranaires mimant au plus près la composition lipidique des membranes naturelles MV1. De plus, un modèle caractérisant MV2 a également été construit afin de pouvoir comparer les propriétés de ces deux membranes, MV1 et MV2, soit une membrane particulière au niveau de la composition lipidique et une membrane plus « classique » essentiellement constituée de PC et de PE (Byrne et al., 2007). Afin de valider nos résultats sur les modèles membranaires et de nous rapprocher au plus près du milieu naturel, nous avons réalisé des expériences préliminaires sur les membranes naturelles extraites des ovocytes fécondés des oursins. Nos études ont été réalisées par RMN des solides sur les noyaux deutérium et phosphore, ce qui nous a permis de caractériser les propriétés structurales et dynamiques de ces membranes, toujours dans le but de les corrélérer aux mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire.

IV.2 Choix et préparation des modèles membranaires

Les modèles membranaires utilisés lors de cette étude sont des vésicules multilamellaires (MLVs), reconnues pour leur facilité de préparation et la présence de bicouches lipidiques, élément fondateur des membranes cellulaires. Afin d'utiliser la RMN du deutérium, nous avons utilisé le POPC_{d31}, marqué au deutérium sur la chaîne *sn2*. Ce choix repose sur le fait que dans nos systèmes, les PC sont essentiellement insaturés et le POPC (16:0 d31- 18:1) est la seule sonde deutérée et insaturée disponible (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA). POPC_{d31} sera donc plus représentatif d'un point de vue biologique que DPPC_{d62} ou DMPC_{d27} par exemple (Larijani et Dufourc, 2006; Garnier-Lhomme et al., 2007).

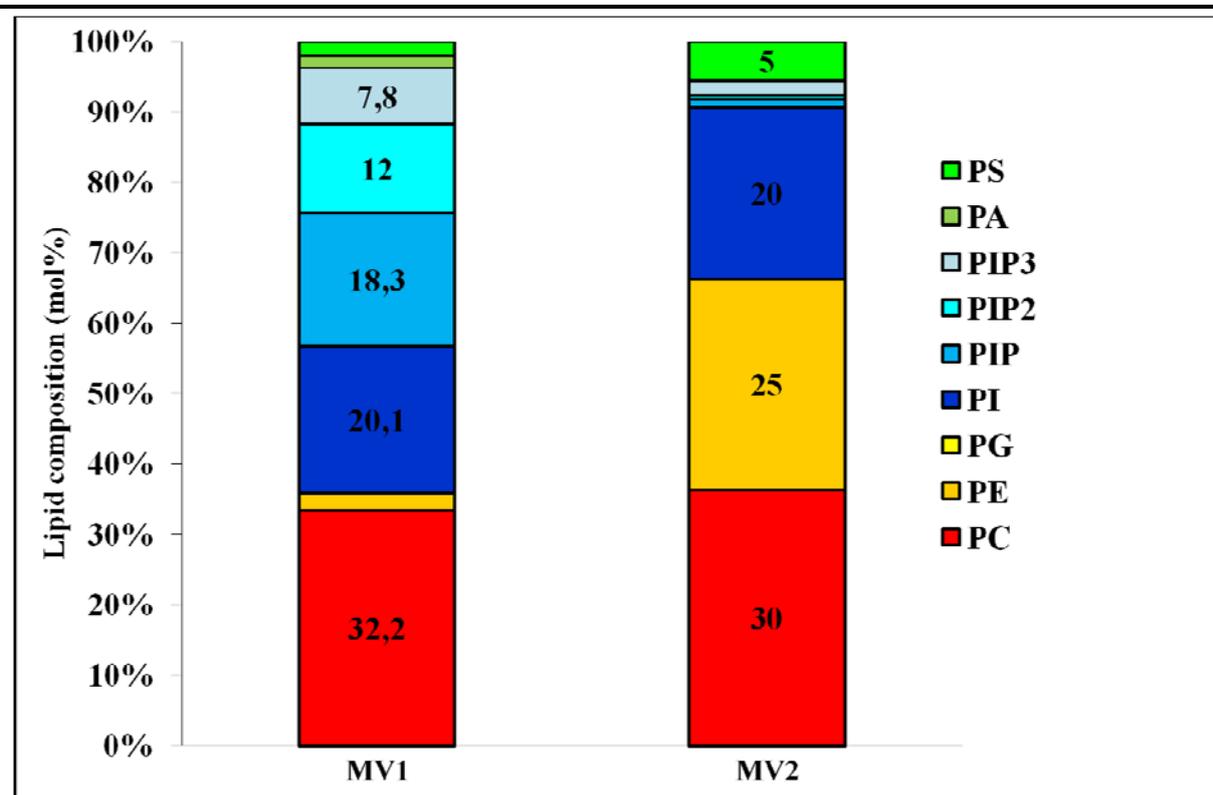


Figure IV-1 Composition en phospholipides des vésicules membranaires MV1 et MV2 (adapté de Byrne et al., 2007 ; Byrne et al., 2009). Les fractions de MV1 et MV2 ont été séparées avec un gradient de sucrose, puis ont été analysées par HPLC-ESI-MS/MS. Les données sont exprimées en pourcentage molaire par rapport à la quantité totale en phospholipides (moyenne \pm SEM avec n = 3 ou 4).

HPLC-ESI-MS/MS: chromatographie liquide haute pression-ionisation à électrospray puis spectrométrie de masse en tandem; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyléthanolamine; PG:phosphatidylglycérol ; PI: phosphatidylinositol; PIP: phosphatidylinositol monophosphate; PIP₂: phosphatidylinositol biphosphate; PIP₃: phosphatidylinositol triphosphate.

		MV1							
	Chaîne lipidiques	ratio molaire							
POPC	16:0; 18:1	30	30	30	30	30	30	30	30
PI ^a	18:0;20:4 ^b	20				20	20	20	20
PIP ^a	18:0;20:4 ^b		18			18		18	18
PIP ₂ ^a	18:0;20:4 ^b			12			12	12	12
PIP ₃	18:0;20:4				8				8

Tableau IV-1 Composition lipidique (ratio molaire) des différents modèles fabriqués pour étudier les propriétés de MV1. a: lipides naturels extraits du foie de bœuf pour PI, et du cerveau de porc pour PIP et PIP₂ (Avanti polar Lipids). b: chaîne prédominante de l'extrait (Avanti polar lipids).

IV.2.1 Le modèle « MV1 »

Les vésicules MV1 sont fortement enrichies en phosphoinositides, soit environ 60% molaire (Figure IV-1). Plusieurs modèles membranaires ont été construits afin dans un premier temps d'étudier l'effet de chaque phosphoinositide: PI, PIP, PIP₂ et PIP₃ (protocole présenté dans le chapitre II). Enfin, un modèle constitué de tous ces lipides a été construit et représentera le modèle le plus proche de MV1. Le choix de la proportion des lipides s'est fait bien entendu sur la proportion de ces lipides dans les membranes naturelles MV1. Les différents ratios utilisés sont présentés dans le tableau IV-1. Il est important de rappeler qu'il existe sept phosphoinositides différents par le nombre et/ou la position de phosphorylation sur le cycle inositol. Dans le cadre de notre étude, PI-4-P (PIP), le PI-4,5-P₂ (PIP₂) et le PI-3,4,5-P₃ (PIP₃) ont été utilisés, étant donné que nous les retrouvons en quantité majoritaire dans nos membranes naturelles. De plus, les chaînes aliphatiques de ces lipides sont longues et fortement insaturées (Byrne et al., 2007). Nous avons alors travaillé avec des chaînes 18 :0/20 :4 afin d'être le plus représentatif possible.

IV.2.2 Le modèle « MV2 »

Les vésicules MV2 présente une composition lipidique plus commune, dérivant notamment du réticulum endoplasmique (Byrne et al., 2007). Afin de comparer les propriétés de ces deux membranes, nous avons décidé de construire un modèle membranaire mimant la composition lipidique des MV2. Ce modèle a été fabriqué à partir d'un mélange de quatre lipides : PC, PE, PI et PS. Ces quatre lipides sont les constituants majoritaires des vésicules MV2 et ont un pourcentage molaire de 30% pour PC, 20% pour PI, 25% pour PE et 5% pour PS (Figure IV-1). Concernant PS et PE, nous avons choisi POPS et POPE (chaîne 16:0/18:1) pour se rapprocher au mieux de conditions physiologiques, ces derniers étant majoritairement insaturés dans les membranes naturelles. Le pourcentage de cholestérol a également été déterminé et s'est révélé être de l'ordre de 20% (Zhendre et al., soumis). Notre modèle mimant les vésicules MV2 sera donc le suivant : POPC/Chol/POPE/LiverPI/POPS 30/20/25/20/5.

IV.2.3 Les modèles constitués de lipides issus des membranes naturelles MV0s

a) Récupération des vésicules membranaires MV0s

Les membranes MV0s sont issues du cytoplasme de l'œuf d'oursins fécondé. Tout le processus de préparation et de récupération se déroule à 16°C (sauf indications contraires),

soit la température physiologique des oursins (Byrne et al., 2009a). Après la récolte des spermatozoïdes et des ovocytes d'oursins, nous procédons à la fécondation. La fécondation se fera par ajout des spermatozoïdes aux ovocytes, précédemment préparés, dans un ratio spermatozoïdes/œufs de 10-100/1. Juste avant la fécondation, un certain nombre de manipulations a été effectué afin de préparer les œufs à la fécondation. Afin d'enlever la couche protectrice entourant les ovocytes (étape qui facilitera la fécondation), les œufs sont resuspendus dans 5 volumes d'eau de mer reconstituée, MPSW, à pH 5,0¹ puis collectés par centrifugation (100 g pendant 1 minute). L'échantillon est ensuite lavé deux fois au MPSW (100g pendant 1 minute), afin de retirer les traces de MPSW pH 5,0. Les œufs passeront au total moins de deux minutes en présence de MPSW pH 5,0. Environ 10 ml des œufs sont resuspendus dans 100 ml de MPSW contenant 3 mM de ATA (acide aurine tricarboxylique : C₂₂H₁₄O₉), ceci afin d'empêcher un durcissement de l'enveloppe de fécondation.

Une fois les spermatozoïdes et les ovocytes en présence l'un de l'autre, la fécondation est vérifiée au microscope (apparition d'une enveloppe de fécondation autour des œufs qui empêche alors les autres spermatozoïdes de rentrer dans l'œuf fécondé) et nous constatons que 90% des ovocytes sont fécondés seulement 30 secondes après l'ajout des spermatozoïdes. Les œufs fécondés sont séparés puis concentrés par centrifugation à 100 g pendant 1 minute. Deux minutes après la fécondation, les œufs sont filtrés à travers un filtre Nytex de 100 µm (Sefar Ltd), afin d'enlever les enveloppes de fécondation puis sont lavés deux fois par centrifugation à 100 g pendant 1 minute dans 10 volumes de MPSW. Les œufs sont lysés dans 10 volumes de tampon de lyse, LB², froid auquel il a été rajouté 1 mM de PMSF³ fraîchement préparé. L'échantillon est ensuite resuspendu dans un volume de LB, puis homogénéisé mécaniquement à l'aide d'une seringue de 10 ml avec une aiguille de 0,7 mm de diamètre. Le mélange est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Nous obtenons ainsi l'extrait du cytoplasme de l'œuf fécondé que nous appellerons S10 (Surnageant obtenu à 10 000 g) (Figure IV-2). S10 est donc constitué des vésicules membranaires MV0s, de protéines solubles, de ribosomes, et de quelques mitochondries.

S10 est ensuite centrifugé dans une centrifugeuse Beckman TLA100.3 à 150 000 g à 4°C pendant deux heures. Le surnageant est récolté puis on relance la centrifugation pour une heure dans les mêmes conditions. Le surnageant contient les protéines solubles et correspond au cytosol de l'œuf fécondé (nous l'appellerons S150) (Figure IV-2). Le culot obtenu après centrifugation est constitué des vésicules membranaires MV0s souhaitées. Les vésicules

¹ Millipore Sea Water, **MPSW, pH 5.0**: Eau de mer artificielle acidifiée avec HCl concentré

² **Tampon de lyse LB (Lysis Buffer)**: 10mM HEPES, 250mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM glycine, 250mM glycérol, 1mM DTT, pH 8.

³ **PMSF solution**: 0.5M PMSF in DMSO.

MV0s sont resuspendues dans le tampon MWB⁴ à raison 200 µl de tampon pour 2 ml de matériel de départ. Les MV0s sont alors congelées à -80 °C, puis conservées à cette température jusqu'à utilisation.

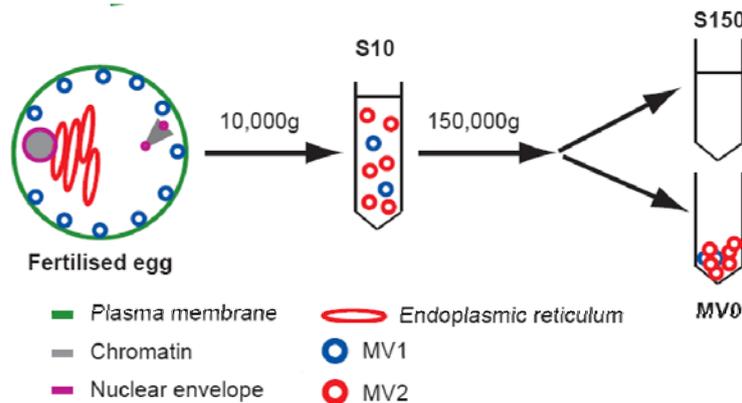


Figure IV-2 Schéma explicatif de la préparation des vésicules membranaires MV0s (Garnier, 2007). Nous partons d'un œuf fécondé que nous allons lyser puis centrifuger à 10 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Nous obtenons alors la fraction S10 qui correspond au cytoplasme de l'œuf fécondé contenant les vésicules MV0s. S10 est ensuite centrifugé à 150 000 g pendant trois heures au total. Nous obtenons alors deux parties : une première correspondant au cytosol de l'œuf fécondé (fraction S150) et une deuxième correspondant à la fraction MV0s.

b) Préparation des modèles membranaires constitués de lipides extraits des MV0s traités ou non avec une phospholipase (PI-PLC bactérienne)

Nous avons préparé deux échantillons : une condition contrôle que nous appellerons MV0s et une condition incubée avec une phospholipase bactérienne spécifique à PI issue de *bacillus cereus* (Sigma-Aldrich) que nous appellerons MV0s + PI-PLC. PI-PLC hydrolyse de manière spécifique PI et engendre donc du DAG (Villar et al., 2000 ; Villar, 2001 ; Ahyayauch et al., 2005)

La suspension de MV0s précédemment préparée est divisée en deux parts égales (350 µL), puis l'un des échantillons est laissé comme tel (condition contrôle) et l'autre est incubé avec 0,2 unit/ml (0,8 mg = 5 units) de PI-PLC bactérienne pendant 20 minutes à température ambiante (Larijani et al., 2001). La solution stock de PI-PLC est préparée en dissolvant 0,8 mg de PI-PLC dans 1 ml de tampon composé de NaCl à 144 mM, de Tris/HCl à 10 mM (pH 7,4), et de 0,02% (w/v) d'albumine sérum bovin. 600 µl de glycérol est ensuite rajouté. Cette solution stock peut être conservée jusqu'à un mois à 4°C. Les lipides des deux échantillons sont ensuite extraits en utilisant une méthode de Folch modifiée (Larijani et al., 2000). On ajoute aux échantillons 4 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 2,5/1. La solution obtenue est soniquée pendant 10 secondes puis laissée à température ambiante pour une heure. La

⁴ **MWB buffer:** "membrane wash buffer", 250mM sucrose, 50mM KCl, 50mM HEPES, 1mM DTT, 1mM ATP, 1mM PMSF, pH 7.5.

solution est filtrée sous vide à l'aide d'une membrane poreuse de 0,22 μm résistante au chloroforme (Durapore filters GVWP04700, Millipore Inc.) puis. On ajoute ensuite 0,2 volume de 0,2 M de K_4EDTA (éthylène diamine tétraacétique) à pH 6,0 à la solution puis celle-ci est centrifugée à 650 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase organique est alors aspirée, récoltée et enfin séchée sous flux d'azote à 30 °C. Les lipides obtenus sont ensuite lyophilisés pendant une nuit puis congelés à -20 °C jusqu'à utilisation. On a obtenu pour chaque échantillon 1 mg de lipides.

IV.3 Les paramètres d'acquisition des expériences de RMN

Différentes températures ont été étudiées: -5, 0, 10 et 20 °C +/- 1 °C. Les échantillons sont stabilisés pendant 30 minutes, avant l'acquisition.

IV.3.1 Les paramètres pour la RMN du deutérium

Les expériences de RMN du deutérium ont été enregistrées à 76 MHz ou 107 MHz au moyen d'une séquence d'écho quadrupolaire (voir chapitre II; Davis, 1976). Les paramètres d'acquisition sont les suivants : fenêtre spectrale de 500 kHz, impulsion 90° de 2,75 à 3,50 μs suivant la puissance utilisée, délai entre les impulsions (délai d'écho) de 30 à 40 μs et temps de recyclage de 1,5 secondes. Les spectres du deutérium sont obtenus au moyen 4k à 50k scans en fonction de la quantité de lipides deutérés présents dans l'échantillon. Un LB (« Line Broadening ») de 200 à 300 Hz a été appliqué avant la transformée de Fourier.

IV.3.2 Les paramètres pour la RMN du phosphore

Les expériences RMN ont été réalisées à 162 MHz and 283 MHz avec une séquence d'écho de Hahn (voir chapitre II; Rance, 1983). Les paramètres d'acquisition sont les suivants: fenêtre spectrale de 75-150 kHz, impulsion à 90 ° de 5,5 à 12,20 μs suivant la puissance utilisée, délai entre les impulsions de 30 à 50 μs et un temps de recyclage de 5 s. 5k scans ont été enregistrés pour les spectres de RMN du phosphore. Un LB de 50 à 100 Hz a été appliqué avant la transformée de Fourier. Les déplacements chimiques du phosphore ont été référencés par rapport à l'acide phosphorique à 85% (0 ppm).

IV.4 Etude de modèles membranaires mimant la composition lipidique des vésicules MV1

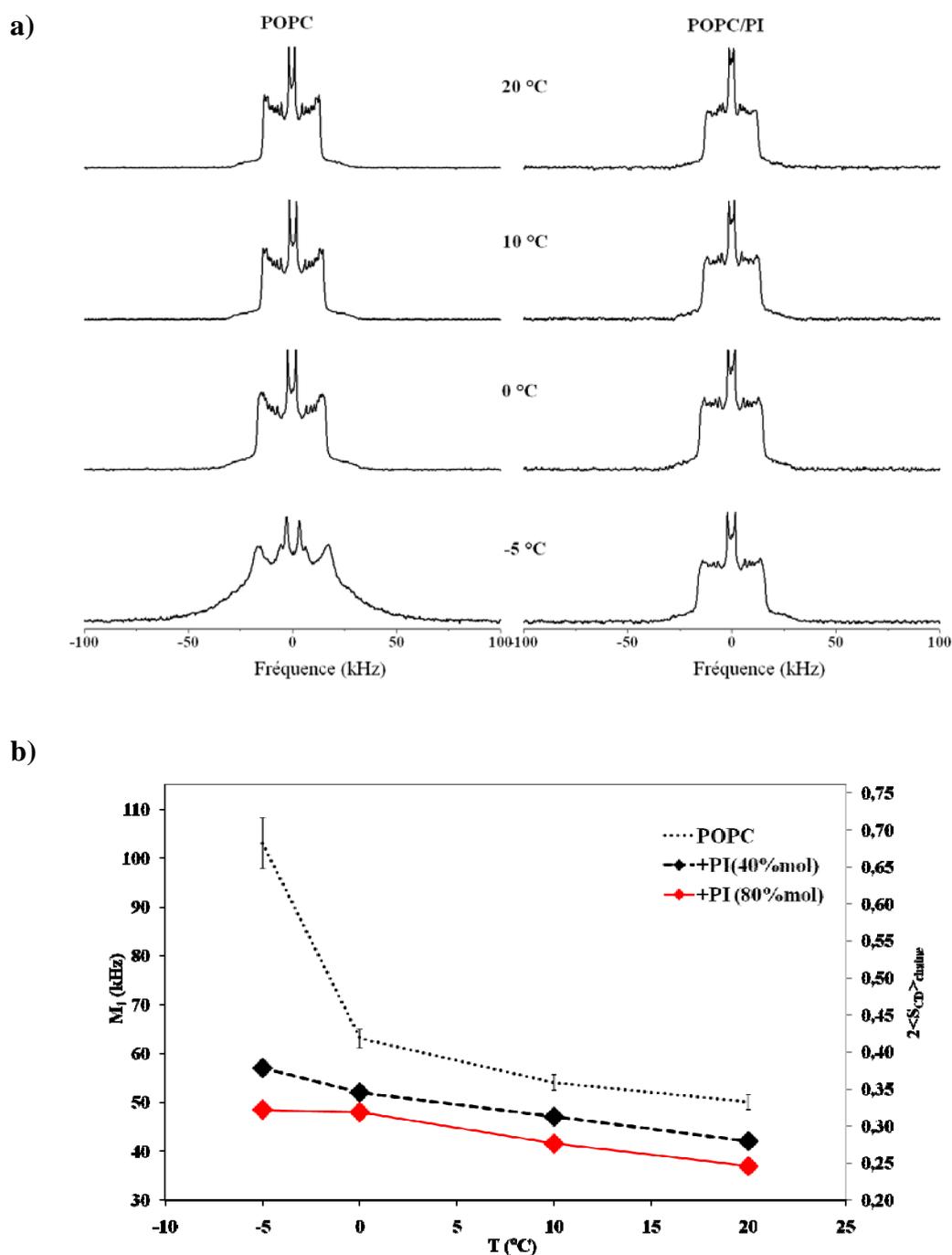


Figure IV-3 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31} et POPC_{d31}/PI. L'échantillon est hydraté à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutééré. Les températures sont indiquées au centre de l'image. Le mélange POPC/PI est composé d'un ratio molaire de 30/20. **b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) et paramètres d'ordre ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température.** L'erreur est estimée à ± 3 -5%. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen de la chaîne lipidique (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01$. En rouge sont représentées les valeurs des M_1 ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) obtenues par Larijani et Dufourc pour POPC/PI 10/40 (Larijani et Dufourc, 2006).

IV.4.1 Etude par RMN du deutérium

a) Les spectres de RMN du deutérium

❖ Influence du phosphatidylinositol (PI)

La première composition étudiée est constituée de POPC et de PI dans un ratio molaire de 30/20. La figure IV-3a montre les spectres de RMN du deutérium pour les compositions POPC_{d31} et POPC_{d31}/PI pour des températures allant de -5 °C à 20 °C. Les spectres de POPC sont caractéristiques d'une phase lamellaire type MLVs (distribution sphérique) avec une transition de phase aux alentours de -5 °C. Les pics les plus intenses correspondent aux groupements méthyles en bout de chaîne aliphatique, les plus mobiles. A -5 °C, nous pouvons observer un spectre large caractéristique d'une phase gel avec néanmoins une légère contribution de phase fluide. Le système se trouve donc dans la zone de transition phase lamellaire gel/phase lamellaire fluide. A partir de 0 °C, nous obtenons des spectres à symétrie axiale caractéristiques d'une phase lamellaire fluide.

Pour le mélange POPC/PI, nous sommes en présence d'une phase fluide dès -5 °C, laissant supposer que PI abaisserait de manière significative la température de transition de phase. Ceci est en accord avec ce qui avait été précédemment observé pour POPC/PI 10/40. L'apparition d'une contribution gel sur les spectres n'a été constatée qu'à partir de -15°C (Larijani et Dufourc, 2006). Nous observons également une diminution de la largeur des spectres pour les autres températures, traduisant une augmentation de la dynamique des chaînes en présence de PI.

Le calcul des moments d'ordre 1, M_1 , et donc du paramètre d'ordre global de la chaîne lipidique, $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$, nous permettent de quantifier la dynamique des chaînes lipidiques dans la membrane (voir chapitre II).

Pour POPC, nous observons une partie de la rupture de pente caractéristique d'une transition de phase lamellaire gel/lamellaire fluide (Figure IV-3b). Pour POPC/PI, la rupture de pente disparaît dans la gamme de températures étudiées (Figure IV-3b). Cette observation confirme une diminution de la température de transition de phase. Les valeurs des M_1 sont plus faibles sur toute la gamme de températures. Par exemple, à 10°C (température proche de la température physiologique des oursins), nous obtenons des M_1 de 47 ± 2 kHz (soit un $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ de $0,31 \pm 0,01$) pour POPC/PI 30/20 à 10 °C et de 54 ± 3 kHz (soit un $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ de $0,36 \pm 0,02$) pour POPC. Ceci démontre une augmentation du désordre, autrement dit de la fluidité, dans la membrane en présence de PI. Larijani et Dufourc avaient déjà observé un effet fluidifiant de PI pour des concentrations plus importantes (Larijani et Dufourc, 2006).

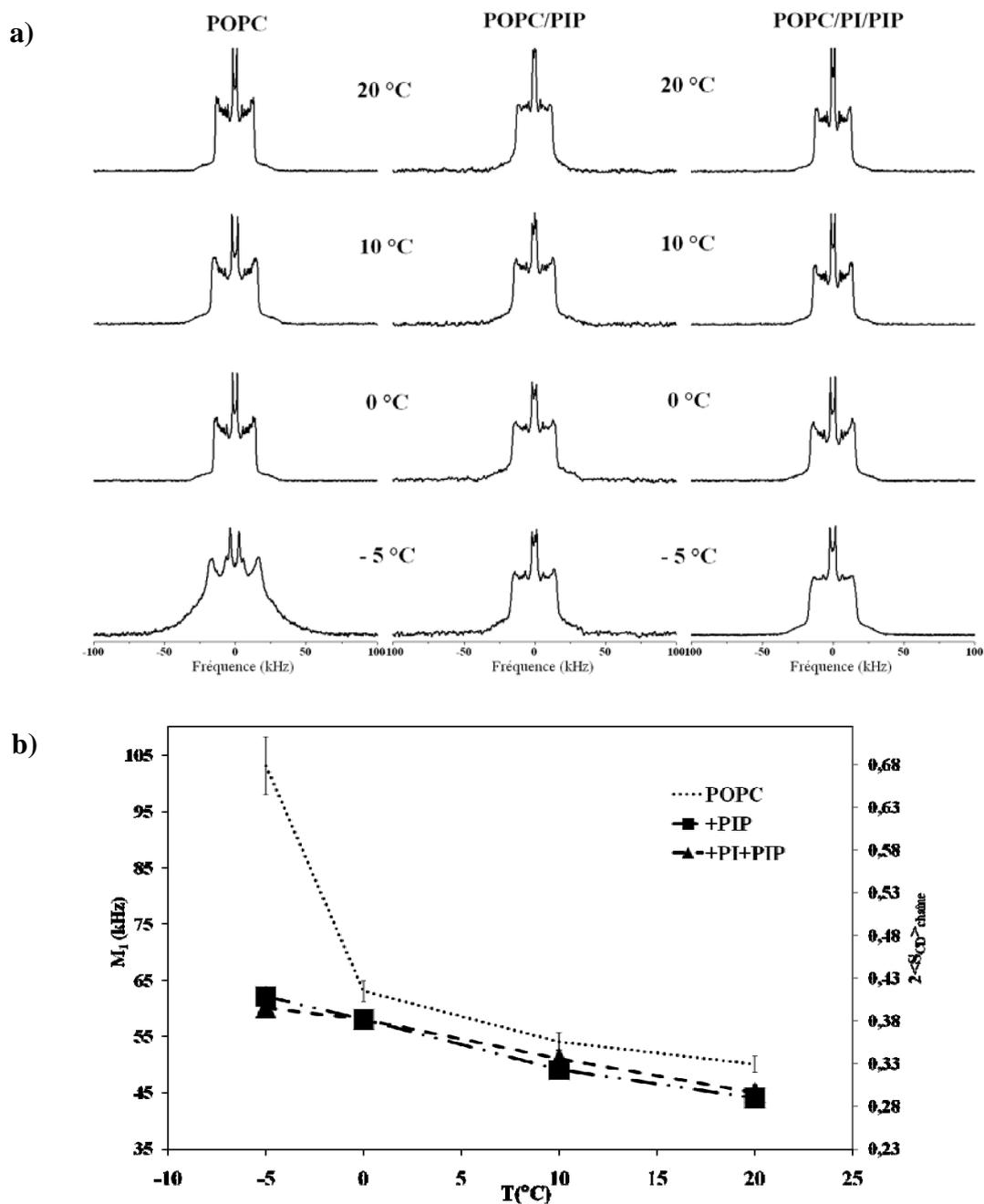


Figure IV-4 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/PIP et POPC_{d31}/PI/PIP. Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutééré. Les températures sont indiquées au centre de l'image. Les mélanges POPC/PIP et POPC/PI/PIP sont composés de ratios molaires de 30/18 et 30/20/18. **b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) et paramètres d'ordre ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température.** L'erreur est estimée à $\pm 3-5\%$. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen de la chaîne lipidique $2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$ (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01$.

Ils avaient également observé que l'effet fluidifiant de PI sur une membrane de DPPC dépendait de la concentration en PI (soit un effet dose). Nous constatons le même phénomène dans les membranes de POPC (Figure IV-3b). En effet, lorsque PI est introduit à hauteur de 80% dans la membrane (soit le double de ce que nous avons étudié), nous constatons que celui-ci fluidifie de manière plus importante la membrane : à 10°C, nous avons mesuré des paramètres d'ordre $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ de $0,27 \pm 0,01$ dans le système POPC/PI 20/80 contre $0,31 \pm 0,01$ et $0,36 \pm 0,02$ pour nos systèmes POPC/PI 60/40 et POPC, respectivement.

❖ *Influence du phosphatidylinositol monophosphate (PI-4-P)*

Nous avons ensuite étudié l'effet de PIP sur POPC dans un premier temps puis sur le mélange POPC/PI (Figure IV-4a). Les ratios utilisés sont 30/18 pour POPC/PIP et 30/20/18 pour POPC/PI/PIP. Les spectres de ces deux modèles nous informent de la présence d'une phase lamellaire. La transition de phase de POPC n'est plus observée pour ces deux systèmes. Comme observé pour PI, la présence de PIP induit une disparition de la transition de phase dans la gamme de températures étudiées. La présence simultanée de PI et de PIP engendre également une disparition de la transition de phase dans la gamme de températures étudiées. Nous constatons également que les spectres obtenus pour les deux systèmes semblent légèrement plus étroits que ceux du modèle POPC, traduisant ainsi une augmentation de la dynamique.

L'étude des moments montre clairement l'absence de transition de phase dans les systèmes POPC/PIP et POPC/PI/PIP dans la gamme de températures étudiées (Figure IV-4b). POPC/PIP possèdent des valeurs de M_1 plus faibles que POPC seul sur la gamme de températures étudiées. A 10 °C, nous obtenons des M_1 de 49 ± 2 kHz (soit un paramètre d'ordre $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,32 \pm 0,01$) pour le système POPC/PIP et de 54 ± 2 kHz (soit un paramètre d'ordre $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,36 \pm 0,01$) pour POPC. POPC/PIP possède donc une dynamique plus importante que POPC seul.

A basse température, le système POPC/PI/PIP donne des valeurs de M_1 plus faibles que POPC. A partir de 0°C, l'augmentation de la dynamique au sein du système POPC/PI/PIP est moins marquée qu'à basse température. Si nous comparons maintenant les modèles POPC/PIP et POPC/PI/PIP, nous constatons que les moments d'ordre 1 (et donc les paramètres d'ordre globaux) sont similaires (variations comprises dans l'erreur expérimentale), traduisant une dynamique similaire dans ces systèmes.

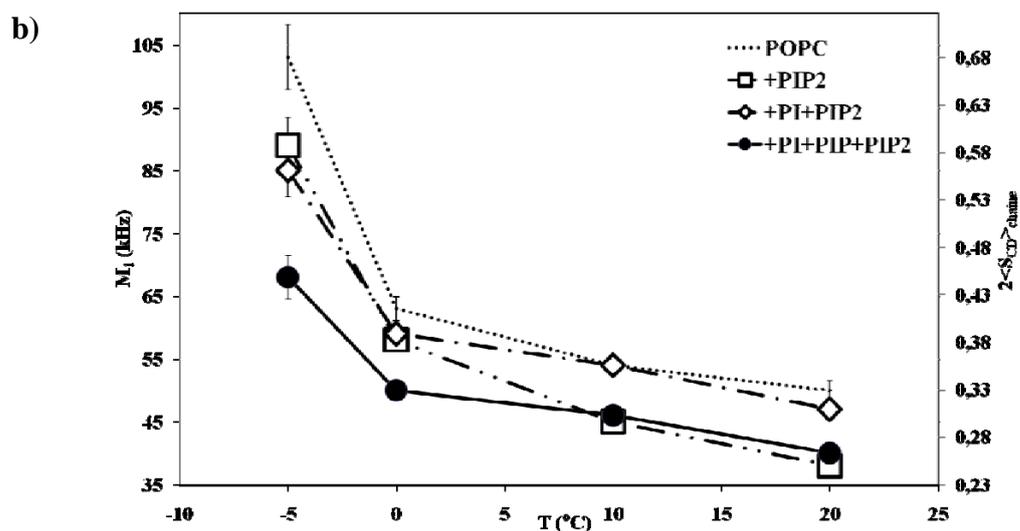
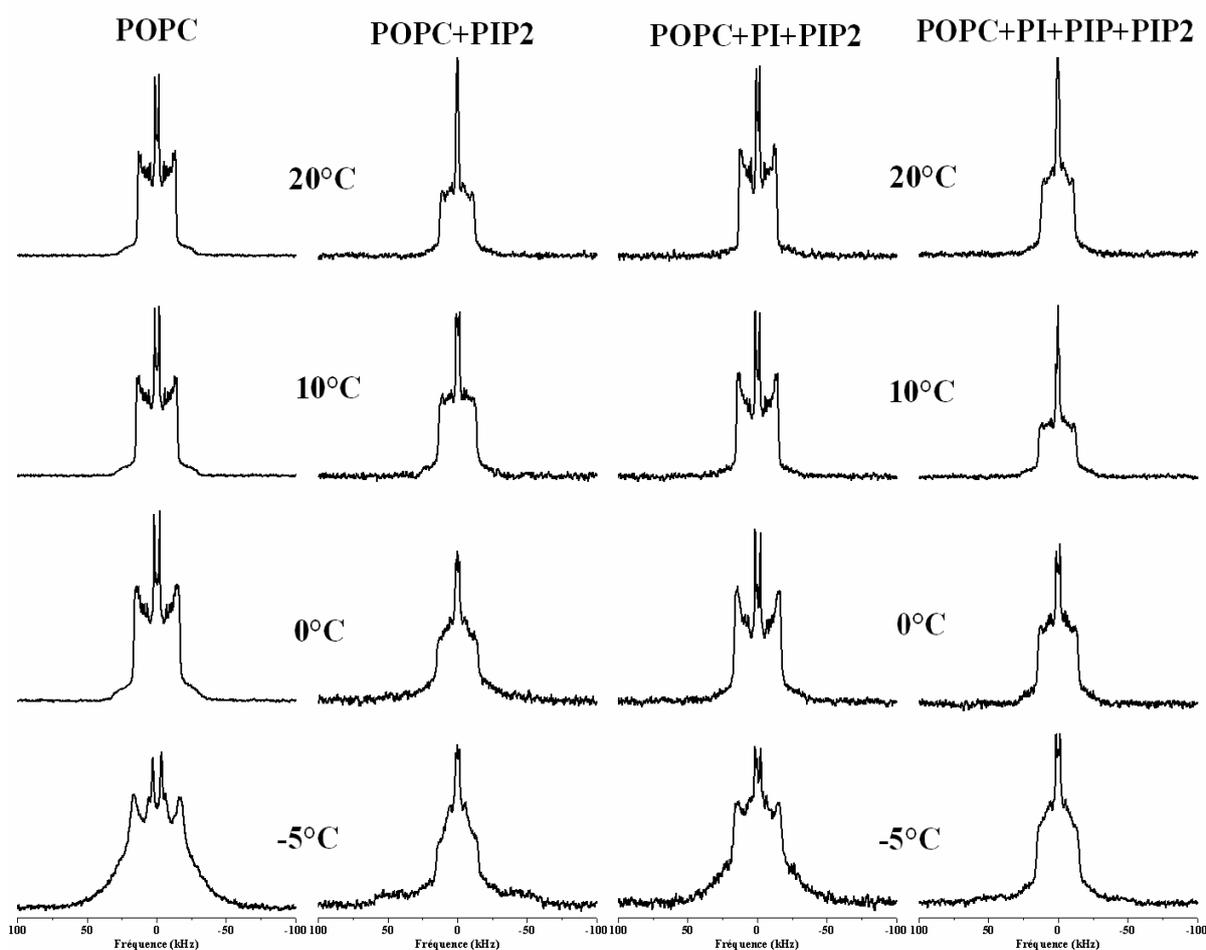


Figure IV-5 Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31} , $\text{POPC}_{d31}/\text{PIP}_2$, $\text{POPC}_{d31}/\text{PI}/\text{PIP}_2$ et $\text{POPC}_{d31}/\text{PI}/\text{PIP}/\text{PIP}_2$. Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutééré. Les températures sont indiquées à gauche et à droite de l'image. Les mélanges POPC/PIP_2 , $\text{POPC}/\text{PI}/\text{PIP}_2$ et $\text{POPC}/\text{PI}/\text{PIP}/\text{PIP}_2$ sont composés de ratios molaires de 30/12, 30/20/12 et 30/20/18/12. **b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) et paramètres d'ordre ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température.** L'erreur est estimée à $\pm 3-5\%$. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen de la chaîne lipidique (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01$.

Ces résultats indiquent que PIP diminuerait la transition de phase de POPC. Il induit également une augmentation de la fluidité membranaire. De plus, nous avons constaté que PI n'augmente pas la fluidité du système PC/PIP.

❖ *Influence du phosphatidylinositol biphosphate (PI-4,5-P₂)*

Trois modèles ont été construits avec ce lipide: POPC/PIP₂ 30/12, POPC/PI/PIP₂ 30/20/12, POPC/PI/PIP/PIP₂ 30/20/18/12. Les spectres RMN du deutérium obtenus pour ces modèles sont présentés à la figure IV-5a. Pour tous les systèmes étudiés, nous sommes en présence d'une phase lamellaire. Cependant, nous avons constaté un effet plus complexe de PIP₂ par rapport aux précédents phosphoinositides étudiés.

Les spectres du système POPC/PIP₂ révèlent que nous sommes en présence d'un mélange à -5 °C d'une phase gel (partie large du spectre et mal défini) et d'une phase relativement fluide (partie plus étroite et intense du spectre). A partir de 0 °C, le sous-spectre correspondant à la phase gel a quasiment disparu et nous sommes donc en présence d'une phase fluide dont la largeur des spectres est plus étroite comparée à POPC. Cette diminution de largeur spectrale est confirmée à plus haute température. De plus, à 20 °C, nous constatons l'apparition d'un pic isotrope (< 5%). Ceci pourrait s'expliquer par la formation de petits objets au sein du système. Cette effet serait du à la présence de PIP₂ dont nous avons déjà montré la tendance à induire la formation de petites vésicules (chapitre III).

La présence simultanée de PI et PIP₂ au sein d'une même membrane induit une phase gel à -5 °C. En effet, nous sommes en présence d'un spectre large comparable en forme à celui obtenu pour POPC pur à la même température. Puis à partir de 0 °C, nous sommes clairement en phase fluide. La largeur des spectres semble similaire à celle des spectres de POPC.

Le troisième modèle d'étude sur PIP₂ composé de POPC, de PI, de PIP et de PIP₂ semble être extrêmement fluide, ce que nous estimons à partir de la largeur spectrale. A -5 °C, il reste une très faible proportion de phase gel que l'on devine à la base du spectre. A partir de 0 °C, nous sommes en phase fluide. A partir de 10 °C, nous observons l'apparition d'un pic isotrope (≈ 5%), pouvant provenir de la formation de petits objets du fait de la présence de PIP₂.

PIP₂ abaisse de manière significative les valeurs des M₁ sur toute la gamme de températures étudiées, traduisant ainsi une augmentation importante de la fluidité. Par exemple, à 10°C M₁ vaut 45±2 kHz ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,30 \pm 0,02$) pour POPC/PIP₂ contre 54±3 kHz ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,36 \pm 0,02$) pour POPC (Figure IV-5b). Nous observons de nouveau une

rupture de pente, ce qui indique que nous sommes dans une zone de transition de phase (en accord avec l'observation spectrale).

Le modèle constitué de POPC, PI et PIP₂ présente des valeurs de M₁ plus faibles comparées à POPC à basse température (de -5 °C à 0°C). A -5 °C, nous sommes également dans une zone de transition de phase. A plus haute température, les valeurs de M₁ deviennent équivalentes à celles de POPC. Cet effet est surprenant, puisque PI et PIP₂, respectivement, ont la capacité de fluidifier les membranes. Ceci laisse donc supposer que PI ou PIP₂ contrebalance l'effet de PI ou PIP₂ en phase fluide.

Dans le modèle POPC/PI/PIP/PIP₂ 30/20/18/12, les valeurs de M₁ diminuent de manière significative sur toute la gamme de températures (Figure IV-5b). En effet, M₁ vaut 46±2 kHz ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,30 \pm 0,02$) à 10 °C dans ce système alors que M₁ vaut 54±3 kHz ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,36 \pm 0,02$) pour POPC, traduisant ainsi une augmentation significative de la fluidité, proche de celle observée pour POPC/PIP₂. A -5 °C, nous avons toujours une contribution gel mais beaucoup moins importante comparé à POPC/PIP₂ et POPC/PI/PIP₂.

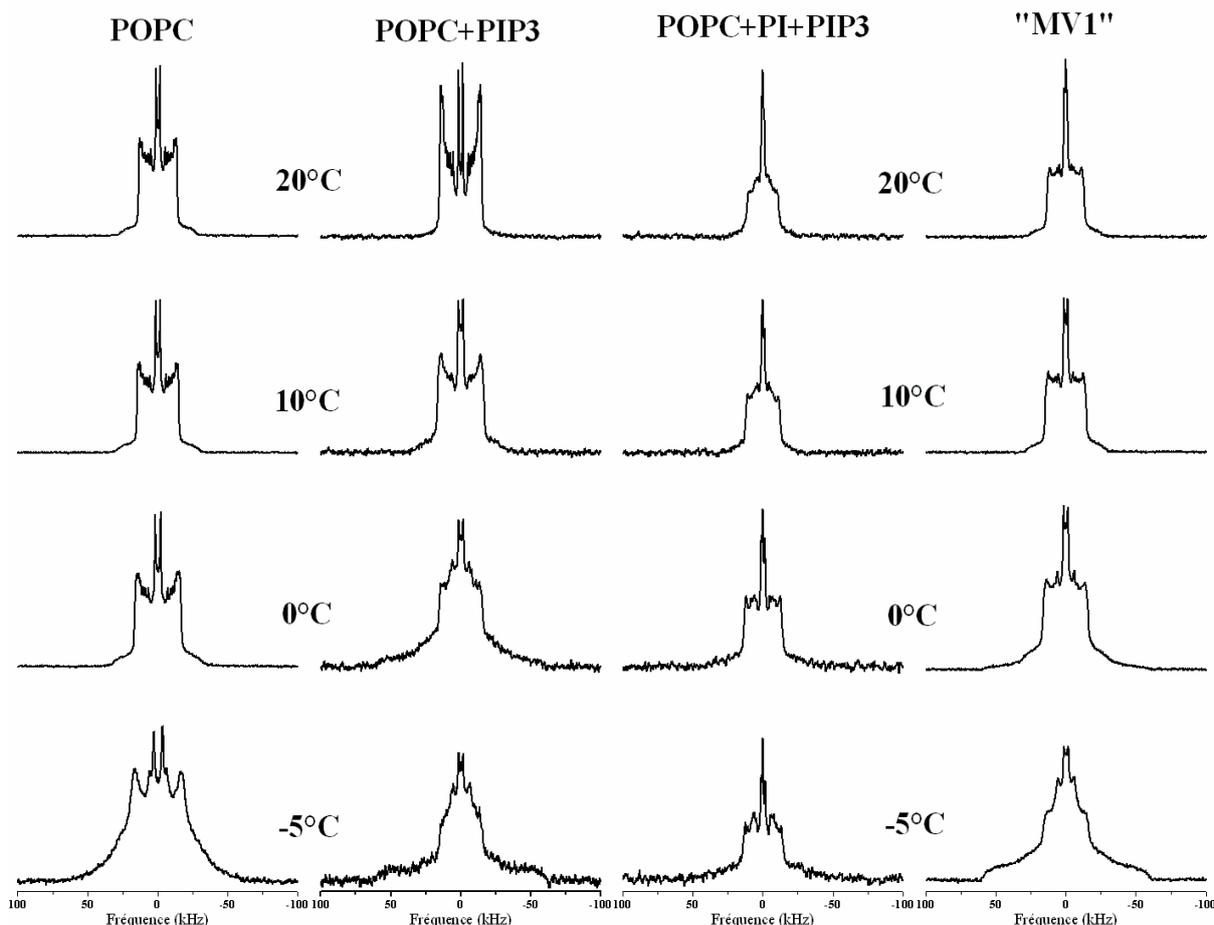
Nous avons observé une transition de phase dans les systèmes contenant PIP₂ contrairement à ceux avec PI ou PIP. PIP₂ induit une fluidification importante de la membrane. La présence simultanée de PI, PIP et PIP₂ dans les membranes induit également une forte fluidification. Cependant, aucun effet de fluidification n'a été constaté dans le système PC/PI/PIP₂ à haute température. Ceci laisse supposer des effets compensateurs dans ce système.

❖ *Influence du Phosphatidylinositol triphosphate (PI-3,4,5-P₃)*

Nous avons ensuite étudié l'effet de PIP₃ sur des modèles composés de POPC, de POPC/PI, et enfin de POPC/PI/PIP/PIP₂ (Figure IV-6a). Ce dernier modèle constituera le modèle le plus proche de la composition lipidique des vésicules MV1.

Pour le modèle POPC/PIP₃, nous sommes en présence d'un mélange de phase fluide et de phase gel de -5 °C à 0 °C. La contribution gel a diminué à cette dernière température. A 10 °C, nous sommes en présence d'une phase lamellaire fluide. Les spectres obtenus sont plus larges que ceux de POPC, indiquant une diminution de la dynamique. A 20 °C, nous obtenons un spectre particulier, dans lequel les orientations à 0°C ne sont plus présentes. On observe ceci par la disparition des épaulements à la base du spectre (correspondant aux orientations à 0°) ainsi qu'une augmentation de la résolution spectrale (Sanders et Prestegard, 1990 ; Aussenac et al., 2003). Deux phénomènes pourraient expliquer cet effet.

a)



b)

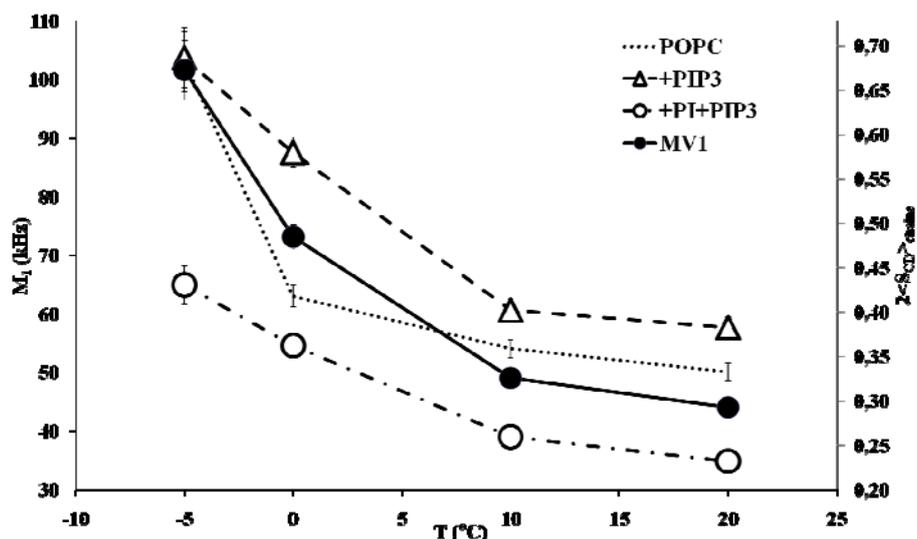


Figure IV-6 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/PIP₃, POPC_{d31}/PI/PIP₃ et POPC_{d31}/PI/PIP₂/PIP₃ (MV1). Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeuté. Les températures sont indiquées à gauche et à droite de l'image. Les mélanges POPC/PIP₃, POPC/PI/PIP₃ et POPC/PI/PIP₂/PIP₃ (MV1) sont composés de ratios molaires de 30/8, 30/20/8 et 30/20/18/12/8. b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) et paramètres d'ordre ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$) calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température. L'erreur est estimée à $\pm 3-5\%$. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen de la chaîne lipidique (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01$.

Premièrement, nous pourrions avoir une déformation de type prolata des liposomes (déformation parallèle à B_0) due au champ magnétique. Ceci a largement été étudié et a pour conséquence une orientation privilégiée à 90° et une augmentation de la résolution spectrale (Seelig et al., 1985 ; Speyer et al., 1987 ; Brumm et al., 1992). Deuxièmement, la formation de bicelles orientées parallèlement au champ magnétique pourrait également expliquer la forme du spectre à 20°C (Raffard et al., 2000 ; Aussenac et al., 2003 ; Diller et al., 2009). Dans ce cas, nous aurions également une orientation privilégiée des lipides qui engendrerait alors une augmentation de la résolution spectrale. Pour ce système et à 20°C , nous aurions donc une déformation des liposomes dans le champ magnétique (16 T dans ce cas) ou la formation de bicelles due à la présence de PIP_3 . Nous pouvons supposer que PIP_3 se positionnerait préférentiellement dans la zone fortement courbée du liposome déformé ou dans le tore de la bicelle. En effet, nous avons vu précédemment, au cours du chapitre III, que PIP_3 posséderait une courbure spontanée positive très importante.

Dans le système POPC/PI/ PIP_3 , nous constatons une fluidification du système. En effet, à 0°C , nous sommes déjà en présence d'une phase lamellaire fluide. De plus, nous observons également un rétrécissement des spectres caractéristique d'une augmentation de la dynamique. A 20°C , un pic isotrope apparaît sur le spectre, traduisant la formation de petits objets du fait de la présence de PIP_3 . En effet, nous avons montré dans le chapitre III que PIP_3 induit la formation de petits objets.

Le dernier modèle étudié et que nous appellerons « MV1 » est constitué de POPC, PI, PIP, PIP_2 et PIP_3 . La composition est POPC/PI/PIP/ PIP_2 / PIP_3 30/20/18/12/8, ce qui est très proche de la composition lipidique de MV1 (Byrne et al. 2007). A -5°C , le spectre révèle la présence d'un mélange de phase gel et de phase fluide. A 0°C , nous sommes essentiellement en phase fluide (il reste qu'une faible proportion de phase gel que l'on devine à la base du spectre). A 10°C et 20°C , nous sommes en phase fluide avec des spectres plus étroits que ceux obtenus pour POPC pur. A 20°C , nous constatons également l'apparition d'un pic isotrope, traduisant la formation de petits objets tels que des petites vésicules. Ceci serait dû à la présence de PIP_2 et PIP_3 dans ce système.

L'étude des M_1 confirme nos observations précédentes (Figure IV-6b). Pour ces trois systèmes, nous nous trouvons dans la zone de transition de phase -5°C . Les valeurs des M_1 du système POPC/ PIP_3 sont plus importantes que celles du système POPC: à 10°C nous avons 54 ± 3 kHz ($2\langle S_{\text{CD}} \rangle_{\text{chaîne}} = 0,36 \pm 0,01$) pour POPC et 61 ± 3 kHz ($2\langle S_{\text{CD}} \rangle_{\text{chaîne}} = 0,40 \pm 0,02$) pour POPC/ PIP_3 . Nous constatons donc une augmentation de l'ordre en présence de PIP_3 .

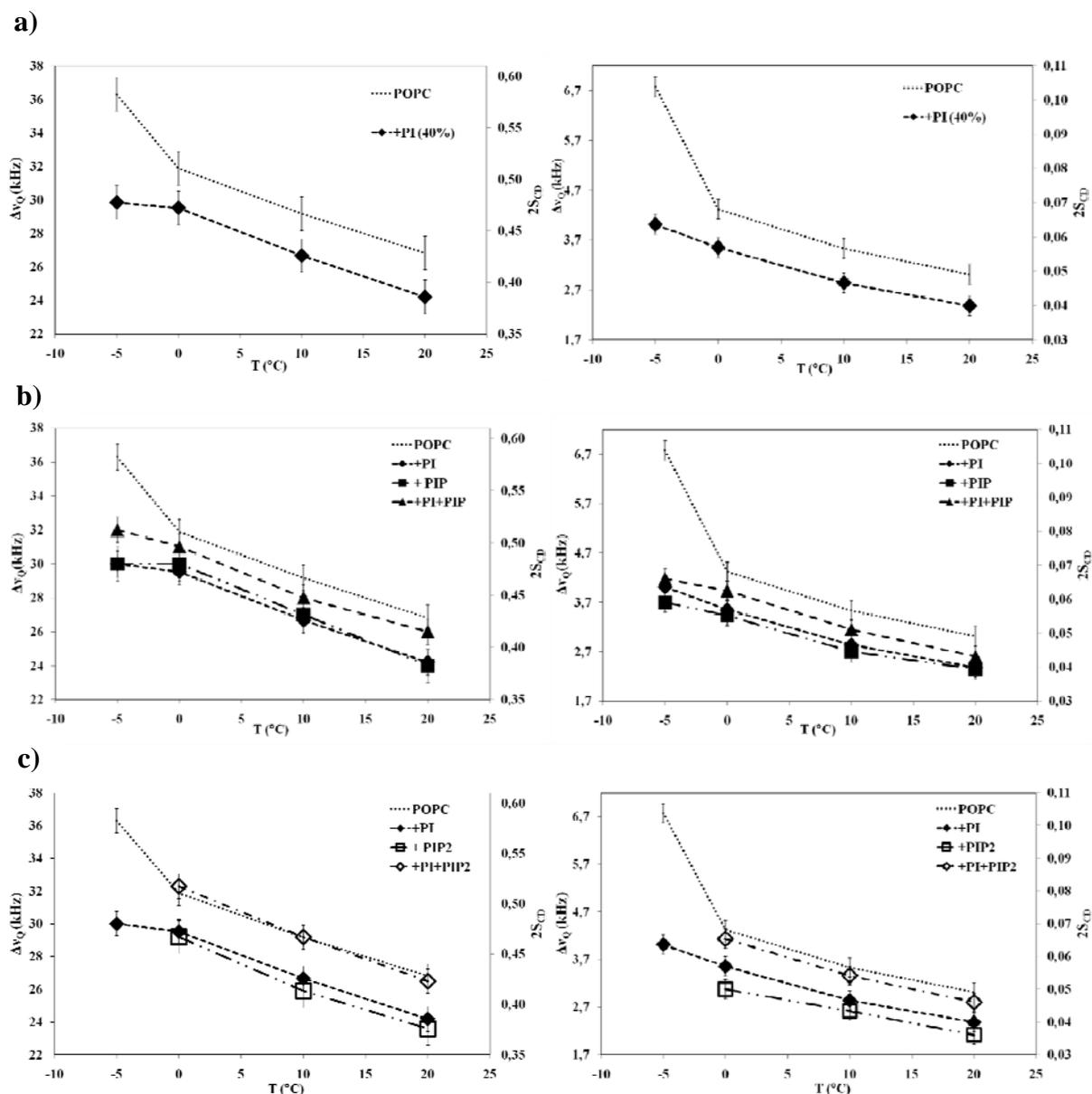


Figure IV-7 Eclatement quadrupolaire et paramètres d'ordre de membranes contenant des PPIs en fonction de la température. A gauche, nous avons les éclatements quadrupolaires correspondant à la région « plateau ». A droite, les éclatements quadrupolaires de la région des méthyles terminaux sont représentés. a) systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/PI. Les mélanges ont pour ratio molaire : POPC/PI 30/20. b) systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/PI 30/20, et POPC_{d31}/PIP 30/18, POPC_{d31}/PI/PIP 30/20/18. c) systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/PI 30/20, POPC_{d31}/PIP₂ 30/12 et POPC_{d31}/PI/PIP₂ 30/20/12. L'erreur est estimée à ± 1 kHz ($\pm 0,02$) et à $\pm 0,2$ kHz ($\pm 0,003$) pour la mesure de l'éclatement quadrupolaire (du paramètre d'ordre) au niveau de la région « plateau » et des méthyles terminaux, respectivement.

En présence de PI, M_1 diminue fortement avec pour valeur 39 ± 2 kHz ($2 \langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,26 \pm 0,01$) à 10°C , indiquant une augmentation du désordre au sein de la bicouche.

Pour le système « MV1 », à haute température, nous obtenons des valeurs de M_1 intermédiaires aux systèmes POPC et POPC/PI/PIP₃. En effet, M_1 vaut 49 kHz ($2 \langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,32 \pm 0,02$) à 10°C , ce qui reste une membrane très fluide. Le système « MV1 » est plus fluide que POPC seul. Cette fluidification résulte d'un effet complexe des divers composants, PI, PIP, PIP₂, et PIP₃, qui considérés séparément, ont la capacité de fluidifier ou de rigidifier les membranes.

Afin d'aller plus loin dans l'analyse des effets d'ordre et de désordre des PPIs, nous avons mesuré les éclatements quadrupolaires des CD₂ (ou CD₃ dans le cas du méthyle terminal) sur toute la chaîne, soit en utilisant la technique de depeaking ou en pointant sur les spectres les pics relatifs à chaque position marquée (voir chapitre II). Ceci nous permet d'accéder au paramètre d'ordre S_{CD} de chaque position marquée dans POPC_{d31}.

b) Etude des paramètres d'ordre S_{CD}

La figure IV-7 présente l'évolution des éclatements quadrupolaires mesurés au niveau de la région « plateau » (gauche) et de la région des méthyles terminaux (droite) pour les différents systèmes étudiés, en fonction de la température. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre correspondant. Nous comparerons tous nos résultats à POPC (contrôle membrane de type classique) et POPC/PI (contrôle membrane fluide). Sur certains modèles, les éclatements quadrupolaires n'ont pas été mesurés à -5°C en raison de la présence non négligeable de phase gel. Dans certains cas, nous avons étudié l'ordre sur toute la chaîne palmitique.

❖ Influence de PI

En premier lieu, nous avons étudié l'effet de PI sur une membrane de POPC (Figure IV-7a). Dans le cas de POPC, les valeurs des paramètres d'ordre au niveau de la région « plateau » varient de $0,58 \pm 0,02$ (-5°C) à $0,43 \pm 0,02$ (20°C). L'addition de PI abaisse les paramètres d'ordre. En effet, nous observons une variation de ces derniers de $0,48 \pm 0,02$ à -5°C à $0,38 \pm 0,02$ à 20°C . Lorsque nous considérons la région en bout de chaîne lipidique (Figure IV-7a graphe de droite), nous constatons également une baisse des paramètres d'ordre. Ces résultats indiquent que PI a un effet fluidifiant ressenti en profondeur dans la bicouche. Une étude du profil d'ordre du système POPC/PI a également été effectuée à 10°C (Figure IV-8B).

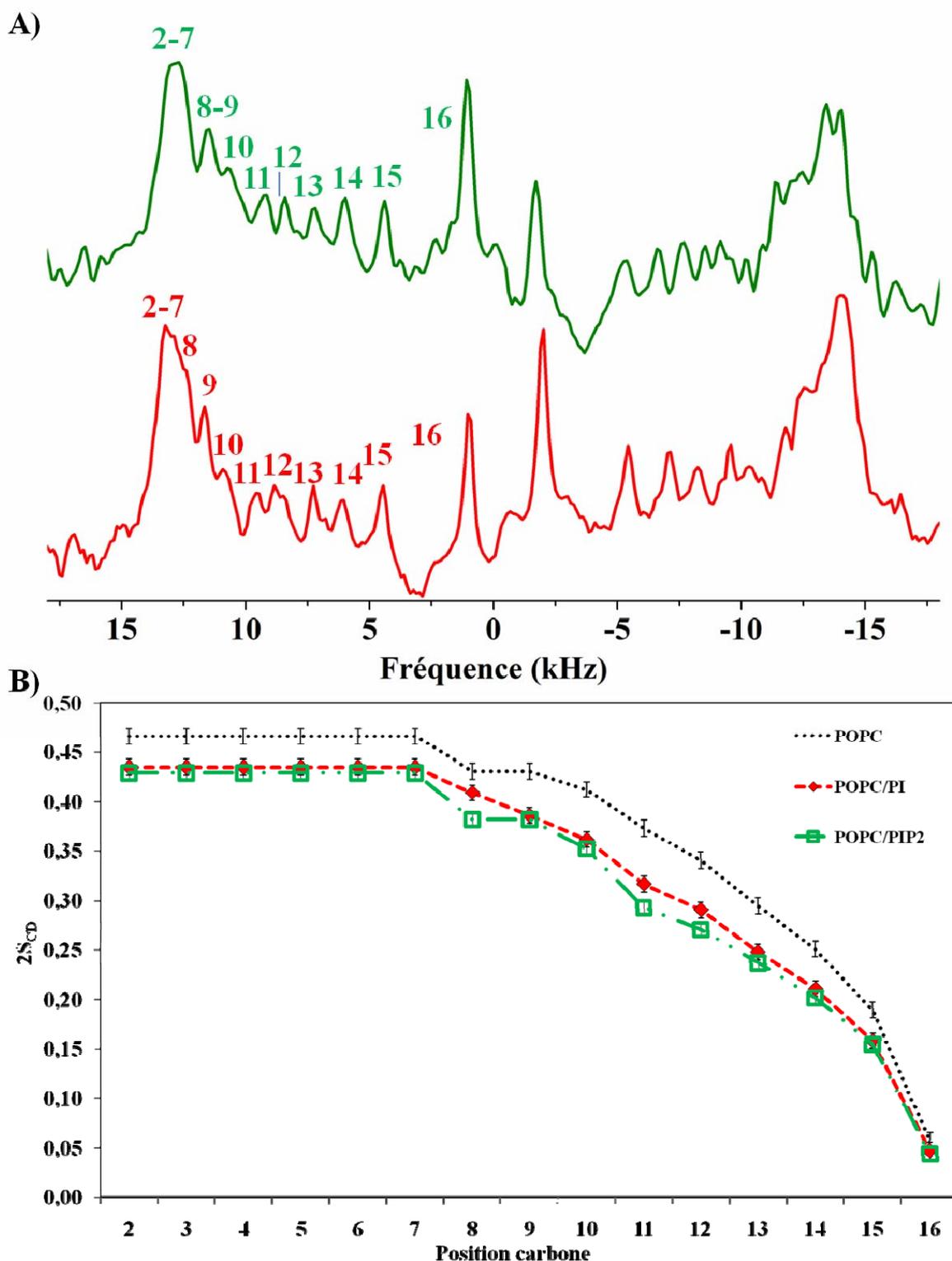


Figure IV-8 Etude du profil d'ordre pour les systèmes POPC, POPC/PI 30/20 et POPC/PIP₂ 30/12. A) Spectres RMN-²H (Echo solide) déconvolués associés à des liposomes de POPC_{d31}/PI (spectre rouge) et POPC_{d31}/PIP₂ (spectre vert) (h=95% dans MOPS pH 7,2 dédeutééré) pour une température de 10°C. Les attributions des pics associés aux positions des C-D2 sur les chaînes lipidiques sont indiquées sur les spectres. B) Profil d'ordre de chaque système. L'erreur est estimée à ±0,01.

Comme expliqué dans le chapitre II, ceci a été déterminé à partir du spectre déconvolué de POPC/PI à cette température (Figure IV-8A spectre rouge). Nous pouvons constater que les paramètres d'ordre obtenus pour le système POPC/PI sont plus faibles que ceux obtenus pour POPC seul sur toute la longueur de la chaîne. Nous avons donc bien une augmentation du désordre à travers la bicouche.

❖ *Influence de PIP*

Pour le système POPC/PIP, les paramètres d'ordre mesurés au niveau de la région « plateau » diminuent comparés à POPC et sont équivalents à ceux obtenus pour le système POPC/PI: en effet, $2S_{CD\text{plateau}} = 0,43 \pm 0,02$ pour POPC/PIP et $0,43 \pm 0,02$ pour POPC/PI à 10 °C (Figure IV-7b). Nous observons le même phénomène au niveau des méthyles terminaux. La présence de PIP induit donc un important désordre au sein des chaînes lipidiques. Comme observé pour PI, cet effet est ressenti en profondeur dans la bicouche. Nous n'avons pas pu déterminer les paramètres d'ordre des positions intermédiaires pour ce système en raison d'un faible rapport signal sur bruit du spectre déconvolué (les pics intermédiaires correspondant aux carbones qui se trouvent entre la région « plateau » et les méthyles ne sont pas résolus).

Pour le système POPC/PI/PIP, nous observons une légère augmentation des paramètres d'ordre par rapport au système POPC/PI de la région « plateau ». Au niveau des méthyles, ce léger effet d'ordre n'est pas ressenti. Ce système possède donc une dynamique intermédiaire à POPC seul et POPC/PI.

❖ *Influence de PIP₂*

PIP₂ augmente le désordre au sein des chaînes lipidiques (Figure IV-7c). A 10 °C, le paramètre d'ordre du système POPC/PIP₂ est de $0,41 \pm 0,02$ contre $0,47 \pm 0,02$ pour POPC. Il est équivalent à celui obtenu pour POPC/PI. L'addition de PIP₂ augmente la dynamique au sein de la membrane. Les résultats obtenus au niveau des méthyles sont en accord avec ceci. L'effet de désordre est donc ressenti en profondeur. Comme pour PI, nous avons effectué une déconvolution spectrale du spectre obtenu pour ce système à 10°C (Figure IV-8A). Ceci nous a donc permis d'étudier le profil d'ordre de la chaîne de POPC dans un tel système (Figure IV-8B). Tout le long de la chaîne lipidique, les paramètres d'ordre sont plus faibles que ceux obtenus pour POPC seul et du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour le système POPC/PI. Ces résultats confirment l'effet de désordre de PIP₂, homogène sur toute la chaîne lipidique. Les paramètres d'ordre pour le modèle POPC/PI/PIP₂ augmentent si on les compare à ceux déterminés pour POPC/PIP₂.

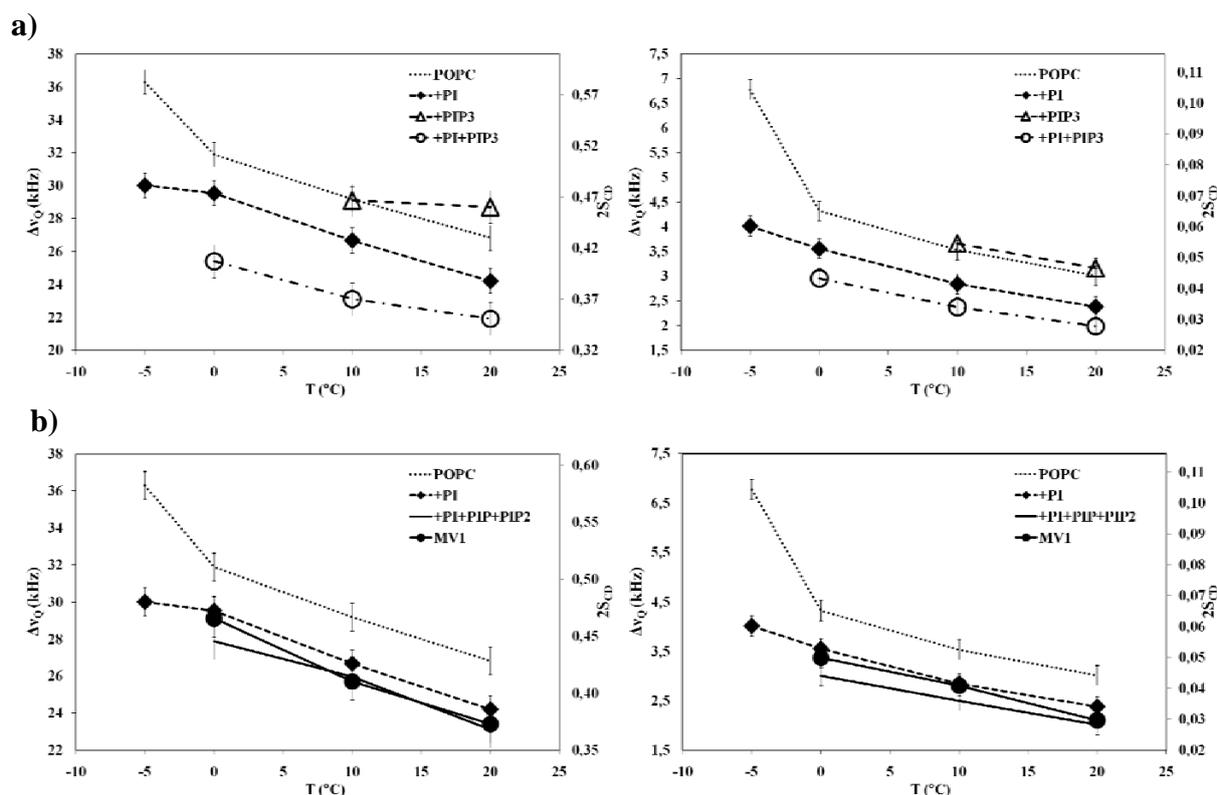


Figure IV-9 Eclatement quadrupolaire et paramètres d'ordre de membranes contenant des PPIs en fonction de la température. A gauche, nous avons les éclatements quadrupolaires correspondant à la région « plateau ». A droite, les éclatements quadrupolaires de la région des méthyles terminaux sont représentés. a) systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/PI 30/20, POPC_{d31}/PIP₃ 30/8 et POPC_{d31}/PI/PIP₃ 30/20/8. b) systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/PI/PIP/PIP₂ 30/20/18/12, et « MV1 » : POPC_{d31}/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/20/18/12/8. L'erreur est estimée à ± 1 kHz ($\pm 0,02$) et à $\pm 0,2$ kHz ($\pm 0,003$) pour la mesure de l'éclatement quadrupolaire (du paramètre d'ordre) au niveau de la région « plateau » et des méthyles terminaux, respectivement.

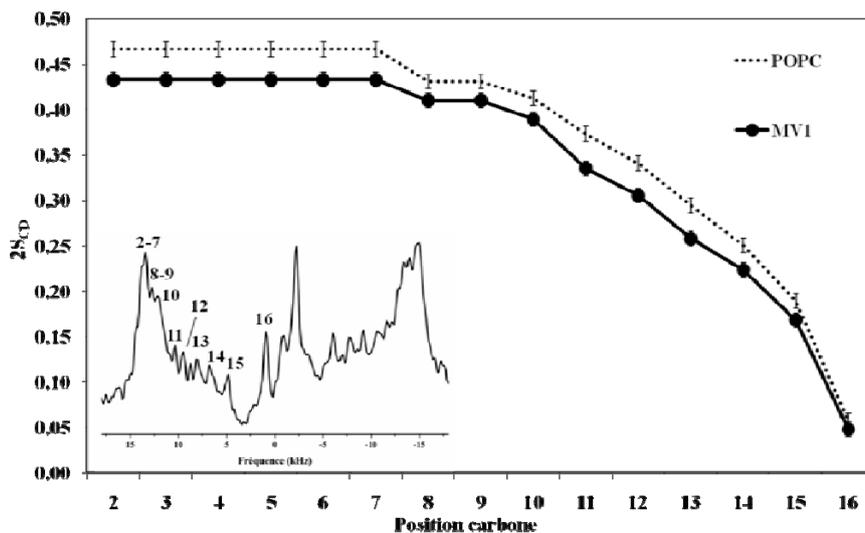


Figure IV-10 Etude du profil d'ordre pour les systèmes POPC et « MV1 » : POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/20/18/12/8. Les paramètres d'ordres sont mesurés à partir des spectres déconvolués de ces systèmes. La température est de 10 °C. L'erreur est estimée à $\pm 0,008$. Sur la même figure est inséré un spectre déconvolué du système MV1 à 10°C.

On obtient des valeurs similaires que celles pour POPC seul. Bien que surprenant, l'effet simultané de PI et PIP₂ n'induit pas de désordre au sein de la membrane de POPC.

❖ *Influence de PIP₃*

PIP₃ a peu d'effet de 10 °C à 20 °C au niveau de la région « plateau » (Figure IV-9a). A 10 °C, les paramètres d'ordre sont équivalents à ceux obtenus pour POPC seul : $0,46 \pm 0,02$ et $0,47 \pm 0,02$, respectivement. Au niveau de la région des méthyles terminaux, nous n'observons pas de différences notables. Nous avons ensuite effectué une déconvolution spectrale du spectre obtenu pour ce système à 10°C. Cependant, la résolution du spectre déconvolué ne permet pas l'attribution des pics intermédiaires.

Le mélange POPC/PI/PIP₃ donne des paramètres d'ordre plus faibles que pour ceux obtenus pour les systèmes POPC seul et POPC/PI sur toute la gamme de température (de $0,41 \pm 0,02$ à $0,35 \pm 0,02$), indiquant ainsi une forte augmentation de la dynamique dans ce système. Un comportement similaire est observé au niveau des méthyles.

❖ *Etude des modèles se rapprochant de la composition lipidique des vésicules MV1*

Si maintenant nous étudions le modèle POPC/PI/PIP/PIP₂, nous constatons que ce dernier est très désordonné au niveau des chaînes lipidiques (Figure IV-9b). En effet, les paramètres d'ordre au niveau du « plateau » sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour le modèle POPC/PI : $0,41 \pm 0,02$ pour POPC/PI/PIP/PIP₂ contre $0,43 \pm 0,02$ pour POPC/PI, à 10 °C. La même tendance est observée au niveau des méthyles.

Si l'on considère maintenant notre modèle final caractérisant MV1 d'un point de vue de la composition lipidique (POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/20/18/12/8), nous constatons que ce système est également très désordonné comparé à POPC. Ce système comporte une dynamique similaire à celle déterminée pour le système POPC/PI. En effet, nous obtenons un $2S_{CD\text{plateau}}$ de $0,41 \pm 0,02$ pour le système MV1, $0,47 \pm 0,02$ pour POPC et $0,43 \pm 0,02$ pour POPC/PI. Le même effet est ressenti au niveau des méthyles. Nous avons donc un effet global de fluidification de la membrane de POPC en présence des phosphoinositides et cette fluidification se fait en profondeur dans la bicouche. La figure IV-10 montre le profil d'ordre le long de la chaîne de POPC au sein du système « MV1 ». Nous constatons que les paramètres d'ordre sont plus bas que ceux obtenus pour le système POPC tout le long de la chaîne (ceci est vrai également au niveau des méthyles même si à cette échelle ce n'est pas évident à constater). Ceci montre que l'effet de fluidification de la membrane par les phosphoinositides est ressenti de façon homogène le long de la bicouche.

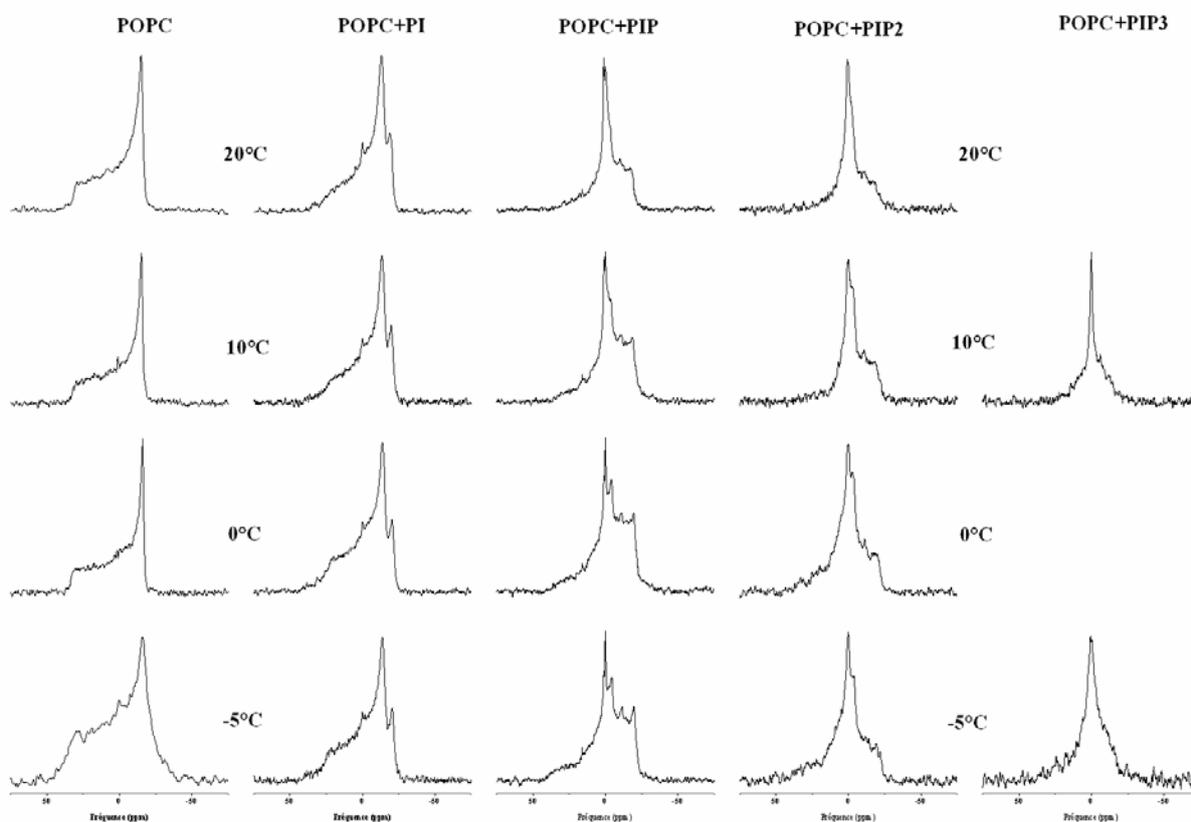


Figure IV-11 Spectres de RMN du phosphore pour les systèmes POPC, POPC/PI, POPC/PIP, POPC/PIP₂ et POPC/PIP₃. Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,0. Les ratios molaires des mélanges sont : POPC/PI 30/20, POPC/PIP 30/18, POPC/PIP₂ 30/12, POPC/PIP₃ 30/8. Les températures sont indiquées sur la figure. Les spectres sont référencés par rapport à H₃PO₄ 85% (0 ppm).

	$\Delta\sigma_{PC}$	$\Delta\sigma_{PI}$	$\Delta\sigma_{PI(4)P}$	$\Delta\sigma_{PI(4,5)P_2}$	$\Delta\sigma_{PI(4)P}$	$\Delta\sigma_{PI(4,5)P_2}$	$\Delta\sigma_{PI(4,5)P_2}$
POPC	-47,0±2,0	-	-	-	-	-	-
POPC/PI	-40,0±2,5	-61,0±2,5	-	-	-	-	-
POPC/PIP	-34,0±2,5	-	-61,0±2,5	-	-15,0±2,5	-	-
POPC/PIP ₂	-34,0±2,5	-	-	-60,0±4,0	-	-15±2,5	-6,0±2,5
POPC/PIP ₃	-	-	-	-	-	-	-

Tableau IV-2 Anisotropie de déplacement chimique du phosphore dans les différents systèmes étudiés. Les valeurs sont exprimées en ppm. L'erreur est estimée directement sur les spectres. Cette attribution est donnée pour une température de 10 °C.

Nous avons étudié la dynamique de modèles membranaires constitués de POPC et de différents mélanges de PPIs caractérisant ainsi les contributions des lipides présents dans MV1. Le modèle « MV1 » présente une dynamique importante, indiquant une membrane très fluide. Afin de compléter cette étude, nous allons étudier la dynamique des têtes polaires des lipides grâce à la RMN du phosphore. Nous avons mentionné précédemment que la forme des spectres du phosphore dépend de la nature de la phase observées. De plus, la largeur spectrale dépend de la dynamique locale et de l'orientation du phosphore. Ces deux méthodes sont donc complémentaires et permettent une caractérisation plus complète de la membrane.

IV.4.2 Etude par RMN du phosphore-31

a) Les spectres de RMN du phosphore

La figure IV-11 regroupe les spectres RMN du phosphore obtenus pour les compositions POPC, POPC/PI, POPC/PIP, POPC/PIP₂ et POPC/PIP₃ pour des températures allant de -5 °C à 20 °C. Les ratios molaires sont les mêmes que ceux étudiés précédemment.

Les spectres de RMN du phosphore de POPC sont des spectres de poudre caractéristiques d'une phase lamellaire non orientée à symétrie axiale (voir chapitre II): le pic le plus intense correspond à l'orientation la plus probable $\beta = 90^\circ$ (β étant l'angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique) (Figure IV-11). On observe une transition de phase aux alentours de -5 °C (information également observée en RMN du deutérium), puisque nous passons d'un spectre d'une phase gel plus large à un spectre rétréci d'une phase fluide (à partir de 0 °C).

L'addition de PI ne change pas la structure de la membrane, nous restons en phase lamellaire (Figure IV-11). Les spectres obtenus correspondent à la superposition de deux spectres de poudre, l'un spectre pour POPC et l'autre pour PI.

Les spectres de POPC/PIP, POPC/PIP₂ et POPC/PIP₃ sont plus compliqués à interpréter (Figure IV-11). En effet, ces spectres sont composés de superpositions de spectres de poudre des différents phosphores présents dans les échantillons : soit 3 pour POPC/PIP, 4 pour POPC/PIP₂ et 5 pour POPC/PIP₃.

Une analyse plus poussée des spectres nous a permis de déterminer la plupart des anisotropies de déplacement chimique, $\Delta\sigma$. Lorsque cela a été possible, nous avons utilisé l'équation reliant l'anisotropie de déplacement chimique aux fréquences de résonances à 0° et à 90° (chapitre II):

$$\Delta\sigma(ppm) = \nu(90^\circ) - \nu(0^\circ)$$

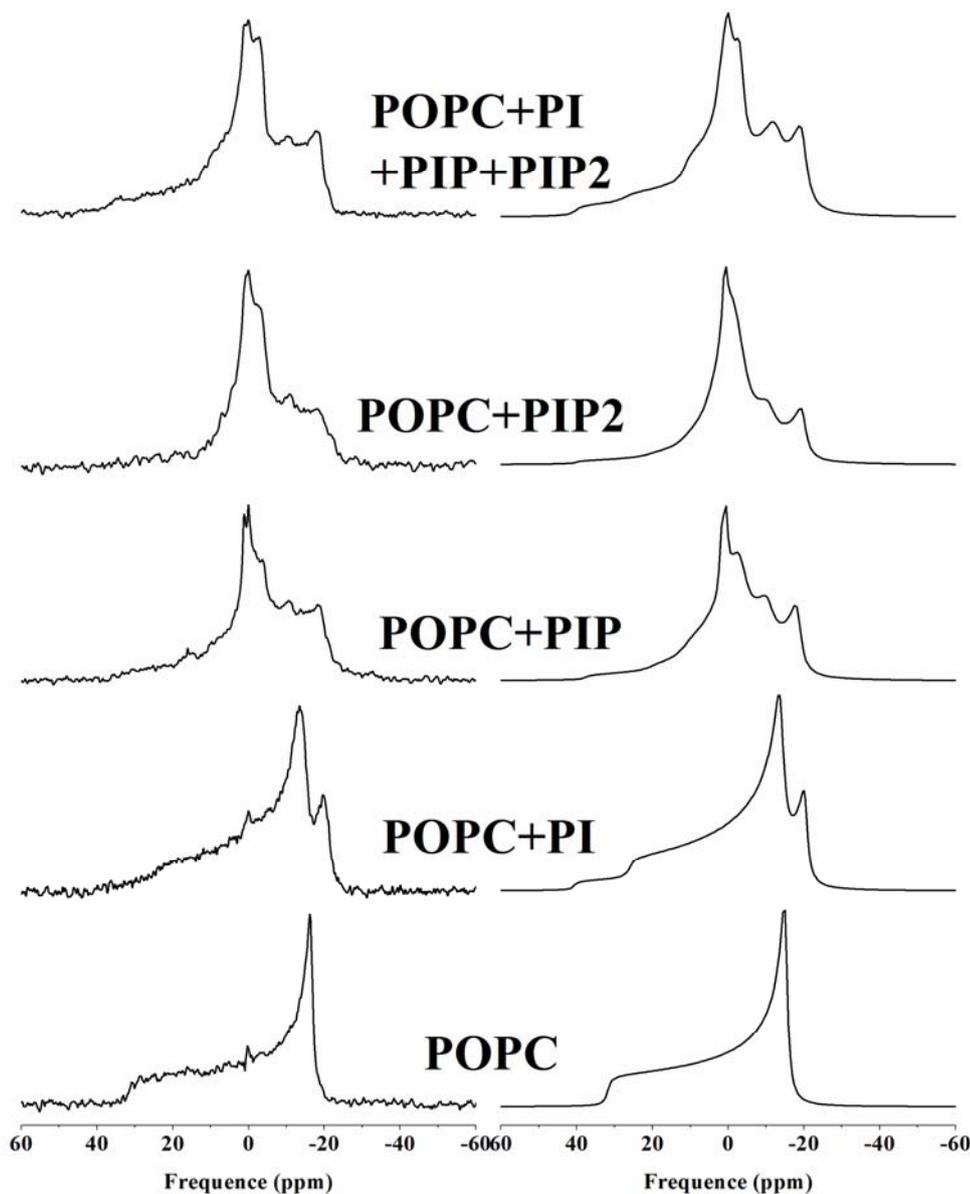


Figure IV-12 Comparaison entre les spectres expérimentaux (gauche) et les spectres simulés des différents systèmes contenant des phosphoinositides. Les systèmes sont les suivants : POPC, POPC/PI 30/20, POPC/PIP 30/18, POPC/PIP₂ 30/12. La température est de 10°C. Les paramètres de simulation sont présentés dans les tableaux IV-3, 4 et 5.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
POPC	-40	600	-1	0,60	1,10
PI	-61	500	-0,40	0,40	1,10

Tableau IV-3 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système POPC/PI 30/20. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C. T_2 est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome déformé en ellipsoïde de révolution (Pott et al., 1995).

Cependant, dans certains cas, la fréquence de résonance correspondant à l'orientation 0° est difficile à mesurer en raison d'un faible rapport signal sur bruit ou de la superposition de plusieurs spectres de poudres. Nous avons alors estimée le $\Delta\sigma$ à l'aide de la formule reliant l'anisotropie de déplacement chimique à la fréquence de résonance à 90° (toujours distinguée) :

$$\Delta\sigma(\text{ppm}) = 3(\nu(90^\circ) - \nu_{iso})$$

où ν_{iso} correspond au déplacement chimique isotrope du phosphore considéré. Les déplacements chimiques isotropes des phosphores présents chez les phosphoinositides ont été déterminés précédemment (voir chapitre III). A partir des anisotropies de déplacement chimique extraites des spectres, nous avons effectué, pour un certain nombre de nos systèmes, des simulations de spectres RMN du phosphore. Ceci a permis une confirmation (ou dans certains cas un affinement) des $\Delta\sigma$ précédemment mesurés (Figure IV-12). Le tableau IV-2 présente les différentes valeurs de $\Delta\sigma$ déterminées à 10°C .

Le glycérophosphate du POPC présente un $\Delta\sigma$ de -47 ± 2 ppm (Tableau IV-2). En présence de PI, l'anisotropie de déplacement chimique de PC est de $-40,0\pm 2,5$ ppm. Par conséquent, l'addition de PI diminue donc le $\Delta\sigma$ de PC (ce qui équivaut à une diminution de la largeur du spectre de poudre de PC). Ceci pourrait signifier deux choses : une augmentation de la dynamique du phosphore du PC et/ou une différence d'orientation de ce même phosphore induit par la présence du PI. Nous avons mentionné un effet de désordre de PI au niveau des chaînes d'acide gras. La diminution du $\Delta\sigma$ de PC serait donc liée à une augmentation du désordre. Nous avons mesuré un $\Delta\sigma$ de $-61,0\pm 2,5$ ppm pour PI. Lors du chapitre III, nous avons mentionné un $\Delta\sigma$ de $-58,0\pm 2,0$ ppm pour PI seul. Nous remarquons donc que la présence de POPC ne modifie pas l'anisotropie de déplacement chimique de PI.

Sur la figure IV-12, nous pouvons comparer le spectre expérimental obtenu pour le système POPC/PI et le spectre simulé pour ce même système à 10°C . Les paramètres optimisés de simulation sont présentés dans le tableau IV-3. Nous avons une bonne concordance entre le spectre expérimental et simulé. Il a été nécessaire d'intégrer le paramètre c/a dans la simulation, traduisant une déformation du liposome par le champ magnétique (voir chapitre II). Le paramètre c/a correspond au rapport entre les deux demi-axes du liposome déformé en ellipsoïde de révolution. Ceci signifie que la présence de PI induirait une légère déformation du liposome par le champ magnétique (pour POPC, ce paramètre vaut 1).

Le spectre RMN du mélange POPC/PIP révèle trois anisotropies de déplacement chimique à 10°C : $-34,0\pm 2,5$ ppm pour POPC, $-61,0\pm 2,5$ ppm pour le phosphodiester de PIP

et $-15,0 \pm 2,5$ ppm pour le phosphomonoester porté par le cycle inositol (Tableau IV-2). Nous constatons donc que le $\Delta\sigma$ du POPC diminue en présence de PIP, traduisant une augmentation de la dynamique comme il a été observé par RMN du deutérium. Le $\Delta\sigma$ du glycérophosphate du PIP est aux alentours de -60 ppm, comme pour PI, et n'est pas modifié par la présence de POPC (voir chapitre III). Lors de l'étude de liposomes constitués exclusivement de PIP (chapitre III), nous avons estimé l'anisotropie de déplacement chimique du phosphomonoester P4 à $-14,0 \pm 2,0$ ppm. Ceci montre que les $\Delta\sigma$ des deux phosphores présents dans PIP ne sont pas affectés par la présence de POPC.

Une simulation d'un spectre RMN du phosphore a été effectuée avec les $\Delta\sigma$ précédemment déterminés. La superposition entre le spectre expérimental et le spectre simulé est satisfaisante (Figure IV-12 ; Tableau IV-4), validant ainsi nos estimations des $\Delta\sigma$. Comme pour le système composé de POPC/PI, il a été nécessaire de tenir compte du rapport c/a lors de la simulation. Celui-ci aurait augmenté, traduisant ainsi une déformation plus importante en présence de PIP. De plus, afin d'optimiser la simulation, nous avons dû intégrer dans le fichier de simulation 10% de contributions isotropes.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
POPC	-34	700	-1	0,30	1,25
PIP	-61	400	-0,4	0,18	1,25
PIP	-15	700	+1	0,18	1,25
PIP_{iso}	0	200	0	0,04	1,25
PIP_{iso}	0	200	+1	0,04	1,25

Tableau IV-4 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système POPC/PIP 30/18. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C. T_2 est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome déformé en ellipsoïde de révolution (Pott et al., 1995)..

Concernant le modèle de membrane POPC/PIP₂, nous avons déterminé quatre anisotropies de déplacement chimique différentes. POPC présente un $\Delta\sigma$ de $-34,0 \pm 2,5$ ppm (Tableau IV-2). Le glycérophosphate de PIP₂ possède un $\Delta\sigma$ de $-60,0 \pm 4,0$ ppm, valeurs comparables entre tous les phosphoinositides étudiés. Nous avons ensuite déterminé deux autres $\Delta\sigma$: un de $-15,0 \pm 2,5$ ppm et un de $-6,0 \pm 2,5$ ppm. En comparant les $\Delta\sigma$ obtenus pour le glycérophosphate et le phosphomonoester P4 de PIP₂ dans le système POPC/PIP₂ et dans le système PIP₂ seul (chapitre III), nous constatons que ceux-ci ne sont pas affectés par la

présence de POPC. En effet, les valeurs déterminées entre ces deux systèmes sont similaires (le $\Delta\sigma$ du phosphore P5 n'avait pu être mesuré à cette température dans le système PIP₂ seul). Nous avons également effectué une simulation de spectre RMN du phosphore (Figure IV-12 ; Tableau IV-5). Nous avons trouvé une bonne concordance entre le spectre expérimental et le spectre simulé, validant nos estimations sur les différents $\Delta\sigma$. La valeur du rapport c/a a légèrement augmenté comparé au modèle POPC/PIP. Pour ce système, une contribution isotrope de 8 % a du être intégrée afin d'obtenir une meilleure simulation du spectre RMN du phosphore.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
<u>POPC</u>	-34	700	-1	0,30	1, 30
<u>PIP₂</u>	-60	400	-0,4	0,12	1, 30
<u>PIP₂</u> (P4)	-15	800	+1	0,12	1,30
<u>PIP₂</u> (P5)	-6	800	0,2	0,12	1,30
PIP2 _{iso} (P5)	0	200	0,6	0,01	1,30
PIP2 _{iso} (P4)	0	200	+1,0	0,01	1,30

Tableau IV-5 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système POPC/PIP₂ 30/12. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C. T₂ est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome déformé en ellipsoïde de révolution (Pott et al., 1995).

Pour le mélange POPC/PIP₃, nous n'avons pu extraire aucune valeur d'anisotropie de déplacement chimique en raison de la superposition de cinq spectres de poudre ainsi que d'un rapport signal sur bruit relativement faible. Cependant, nous pouvons constater que la forme globale du spectre est similaire à celle obtenue pour le système POPC/PIP₂ avec une contribution fine plus intense.

La figure IV-13 montre les spectres obtenus pour les modèles POPC/PI/PIP/PIP₂ et « MV1 » (POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃) à 10 °C. Le spectre de ce premier modèle est relativement complexe et résulte de la superposition des différents spectres de poudre caractéristiques de phases lamellaires. Nous avons estimé les différentes anisotropies de déplacement chimique en nous basant sur les attributions dans les systèmes binaires. Afin de valider nos différents $\Delta\sigma$, nous avons effectué une simulation spectrale à partir des données estimées (Figure IV-12). Les paramètres de simulation sont présentés dans le tableau IV-6. Nous obtenons une simulation tout à fait satisfaisante.

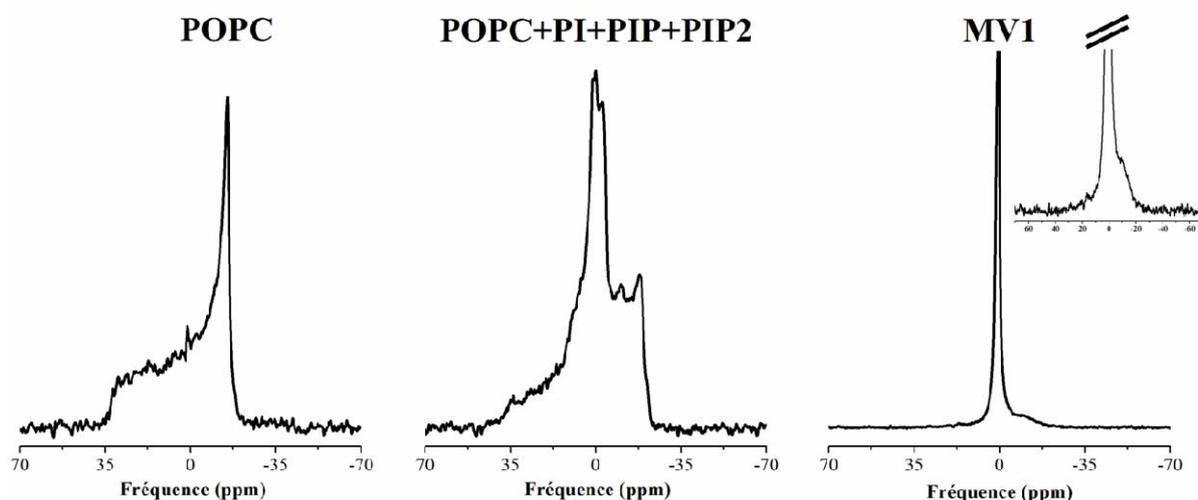


Figure IV-13 Spectres de RMN du phosphore pour les systèmes POPC, POPC/PI/PIP/PIP₂ 30/20/18/12 et POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/20/18/12/8(MV1). Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,0. Les spectres ont été enregistrés à 10°C. Les spectres sont référencés par rapport à H₃PO₄ 85% (0 ppm). Un zoom a été effectué pour le spectre correspondant au système « MV1 » afin de visualiser la base du spectre.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
<u>POPC</u>	-40	700	-1	0,28	1, 10
<u>PI</u>	-60	500	-0,40	0,20	1,10
<u>PIP</u>	-60	500	-0,40	0,18	1,10
<u>PIP₂</u>	-60	500	-0,40	0,12	1, 10
<u>PIP</u>	-15	400	+1	0,18	1,10
<u>PIP₂</u> (P4)	-15	400	+1	0,12	1,10
<u>PIP₂</u> (P5)	-3	400	+0,2	0,12	1,10

Tableau IV-6 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système POPC/PI/PIP/PIP₂ 30/20/18/12. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C. T₂ est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome.

	$\Delta\sigma_{PC}$	$\Delta\sigma_{PI}$	$\Delta\sigma_{PI(4)P}$	$\Delta\sigma_{PI(4,5)P2}$	$\Delta\sigma_{PI(4)P}$	$\Delta\sigma_{PI(4,5)P2}$	$\Delta\sigma_{PI(4,5)P2}$
PC/PI/PIP/PIP ₂	-40,0±2,0	-60,0±5,0	-60,0±5,0	-60,0±5,0	-60,0±5,0	-14,0±2,5	-3,0±2,5

Tableau IV-7 Anisotropie de déplacement chimique du phosphore pour le système POPC/PI/PIP/PIP₂. Les valeurs sont exprimées en ppm. L'erreur est estimée directement sur les spectres. Cette attribution est donnée pour une température de 10 °C.

Les $\Delta\sigma$ plus larges (aux alentours de 60ppm) sont attribués aux glycérophosphates des phosphoinositides. Le $\Delta\sigma$ de $-32,0\pm 2,0$ ppm est celui de POPC. POPC présente donc une dynamique plus importante en présence de ces trois PPIs. Nous avons ensuite deux valeurs de : $-14,0\pm 2,5$ ppm et $-3,0\pm 2,5$ ppm. Celles-ci sont attribuées aux phosphores mobiles présents sur les cycles inositol de PIP et PIP₂. Les positions 4 pour PIP et PIP₂ ne sont pas différenciées et on obtient qu'une seule anisotropie de déplacement chimique de $-14,0\pm 2,5$ ppm. Le dernier phosphore en position 5 de PIP₂ a un $\Delta\sigma$ de $-3,0\pm 2,5$ ppm. Nous constatons que les $\Delta\sigma$ de PI, PIP, et PIP₂ sont similaires à ceux obtenus pour les systèmes binaires et pour les systèmes exclusivement constitués des PPIs (chapitre III).

Le spectre du modèle MV1 semble être essentiellement composé d'un spectre isotrope bien que nous observons à la base du spectre une contribution plus large (Figure IV-13). Ceci semble surprenant, notamment si nous comparons ces observations avec celles obtenues par RMN du deutérium où nous avons clairement observé des spectres caractéristiques d'une phase lamellaire. Il est impossible d'obtenir les $\Delta\sigma$ dans ce système. Ceci sera discuté ultérieurement.

IV.5 Etude d'un modèle membranaire mimant la composition lipidique des vésicules MV2

Nous allons maintenant étudier un modèle membranaire mimant les vésicules membranaires MV2. MV2 a une composition lipidique plus classique puisque cette membrane est majoritairement composée de PC, de PE et de cholestérol (Byrne et al., 2007). Les vésicules MV2 représentent la plus grande contribution membranaire de MV0s (Collas et Poccia, 1996).

Il est donc intéressant d'étudier les caractéristiques de cette membrane afin de les comparer avec celles obtenues pour MV1.

IV.5.1 Etude par RMN du deutérium

a) Les spectres de RMN du deutérium

La figure IV-14a présente les spectres de RMN du deutérium obtenus pour des liposomes de POPC (à titre de contrôle) et pour le modèle « MV2 » pour des températures allant de -5 °C à 20 °C. La composition du modèle membranaire « MV2 » est la suivante : POPC/Chol/PE/PI/PS 30/20/25/20/5.

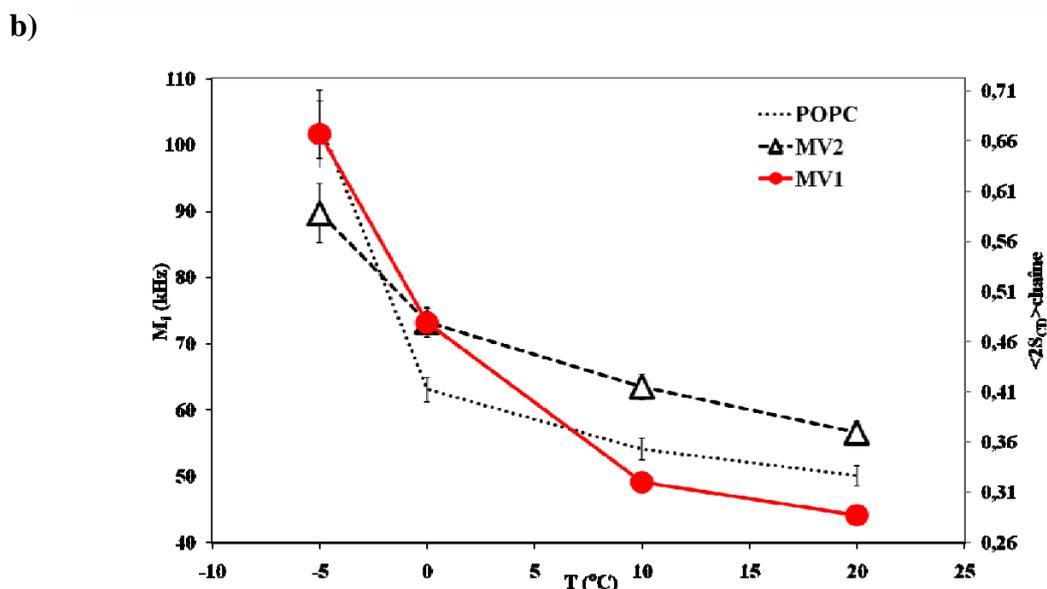
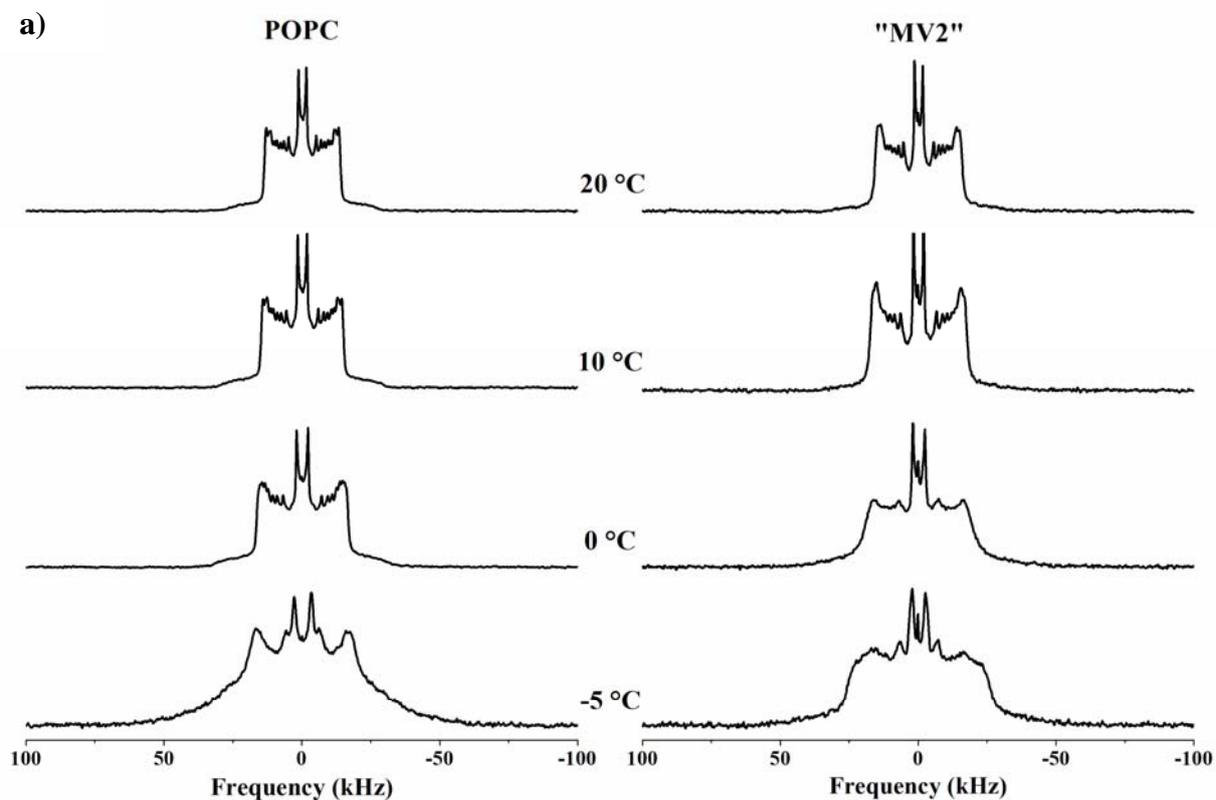


Figure IV-14 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/Chol/POPE/PI/POPS (MV2). Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutéié. Les températures sont indiquées au centre de l'image. Le mélange POPC/Chol/POPE/PI/POPS (MV2) est composé du ratio molaire de 30/20/25/20/5. **b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) et paramètres d'ordre ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température.** En rouge, l'évolution des moments du système MV1 (POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/20/18/12/8) est indiquée à titre de comparaison. L'erreur est estimée à 5%. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen de la chaîne lipidique (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01$.

A -5 °C, nous sommes en présence d'un spectre large dont la forme globale est différente de celle du spectre obtenu pour POPC seul. Ce spectre résulte de la superposition de deux spectres de poudre : un spectre caractéristique d'une phase gel et un spectre caractéristique d'une phase liquide ordonnée (lo). L'apparition d'une phase liquide ordonnée dans les systèmes contenant du cholestérol (à partir de 20% molaire) est largement été démontré (Vist et Davis, 1990 ; Pott et al., 1995 ; Faure et al., 1996 ; McMullen et al., 2004 ; Beck et al., 2007 ; Dufourc, 2008). Dans cette phase, les lipides gardent une diffusion latérale comparable à une phase purement fluide, mais les chaînes aliphatiques sont fortement ordonnées. On parle alors communément de la phase lo comme une phase qui partage les propriétés de la phase fluide et d'une phase gel (Aussenac et al., 2003 ; Beck et al., 2007 ; Dufourc, 2008). A 0 °C, nous constatons que la largeur du spectre a diminué. Il reste cependant une faible contribution de phase gel. Nous remarquons également que la largeur des raies individuelles a augmenté. Ceci est caractéristique d'un échange à vitesse intermédiaire entre deux phases. Dans notre cas, POPC s'échangerait entre la phase gel restante et la phase liquide ordonnée riche en cholestérol. A 10 °C et 20 °C, nous obtenons des spectres caractéristiques d'une phase liquide ordonnée (Vist et Davis, 1990).

Dans un deuxième temps, nous avons reporté les valeurs du moment de premier ordre et du paramètre d'ordre global de chaîne en fonction de la température (Figure IV-14b). Nous constatons que le paramètre $2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$ diminue à -5 °C et augmente à partir de 0 °C si l'on compare aux paramètres d'ordre obtenus pour POPC seul. Ceci est caractéristique de l'effet « cholestérol » (Dufourc et al., 1984 ; Vist et Davis, 1990 ; Marsan et al., 1999 ; Beck et al., 2007 ; Dufourc, 2008). Ceci se traduit par une diminution de l'ordre en dessous de 0 °C et une augmentation de l'ordre au dessus de 0 °C.

Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus pour le système « MV1 » (POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/20/18/12/8), nous constatons qu'à 10 °C (température qui nous intéresse pour corréler les observations faites avec le système d'étude de l'enveloppe nucléaire), le système « MV2 » présente un ordre bien plus important. En effet, nous obtenons des valeurs de $2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$ de $0,42 \pm 0,02$ pour le modèle « MV2 » et de $0,29 \pm 0,01$ pour le système « MV1 ». Ceci s'avère particulièrement intéressant et sera discuté ultérieurement.

b) Etude du profil d'ordre du modèle membranaire « MV2 »

La figure IV-15 représente l'évolution du paramètre d'ordre des groupements C-D₂ en fonction de la position du carbone considéré sur la chaîne deutérée de POPC. Ce profil d'ordre a été effectué à 10 °C. Nous constatons que le modèle MV2 possède des paramètres

d'ordre plus importants (caractéristiques d'une phase liquide ordonnée contenant environ 20% de cholestérol (Garnier-Lhomme et al., 2007)) que ceux obtenus pour POPC, sauf au niveau des méthyles où les paramètres d'ordre deviennent équivalents. Ceci confirme que nous avons bien un effet d'ordre au sein des membranes « MV2 » comparé à des membranes de POPC et que cet effet est ressenti de façon homogène sur pratiquement toute la longueur de la chaîne de POPC. Nous remarquons également que le système « MV2 » présente des paramètres d'ordre plus importants que le système « MV1 » pour toutes les positions. Ceci confirme nos précédentes observations et montre que cette différence d'ordre est conservée en profondeur dans la membrane.

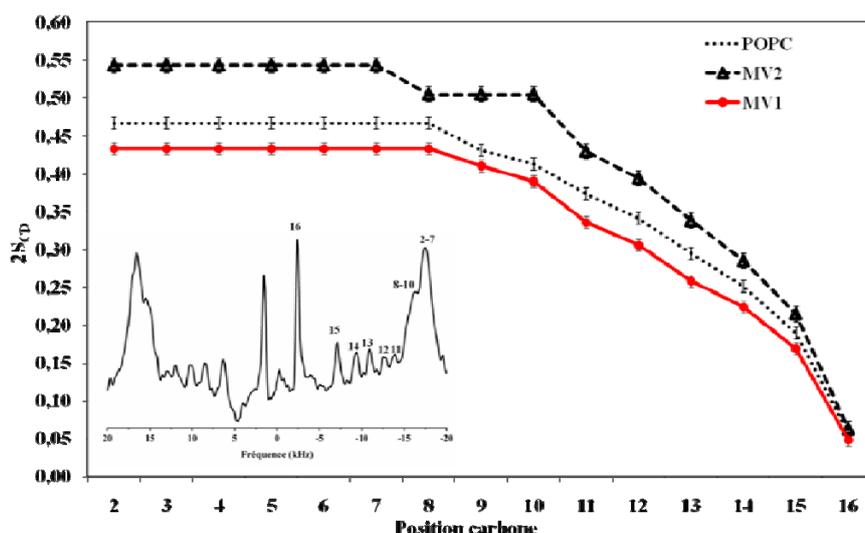


Figure IV-15 Etude du profil d'ordre pour les systèmes POPC et « MV2 » : POPC/Chol/POPE/PI/PS 30/20/25/20/5 et comparaison avec le profil d'ordre du système « MV1 » : POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃. Les paramètres d'ordres sont mesurés à partir des spectres déconvolués de ces systèmes. La température est de 10 °C. L'erreur est estimée à $\pm 0,008$. Sur la même figure est inséré un spectre déconvolué du système MV2 à 10°C.

IV.5.2 Etude par RMN du phosphore-31

a) Les spectres de RMN du phosphore

La figure IV-16 présente les spectres RMN du phosphore obtenus pour les modèles POPC et « MV2 », pour des températures allant de -5°C à 20°C.

D'après l'allure générale des spectres, nous pouvons en conclure que nous sommes en phase lamellaire. Nous remarquons la présence d'un pic isotrope (<5 %). Ceci pourrait résulter de la formation de petits objets (vésicules de faible taille). Une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) montre qu'il n'y a pas de dégradation des lipides, pouvant conduire aussi à une raie isotrope. A -5°C et 0°C, les spectres obtenus sont larges et mal résolus. Par RMN du deutérium, nous avons observé un mélange de phase gel et de phase liquide ordonnée. Les spectres de RMN ³¹P obtenus seraient donc la résultante de ce mélange de phases.

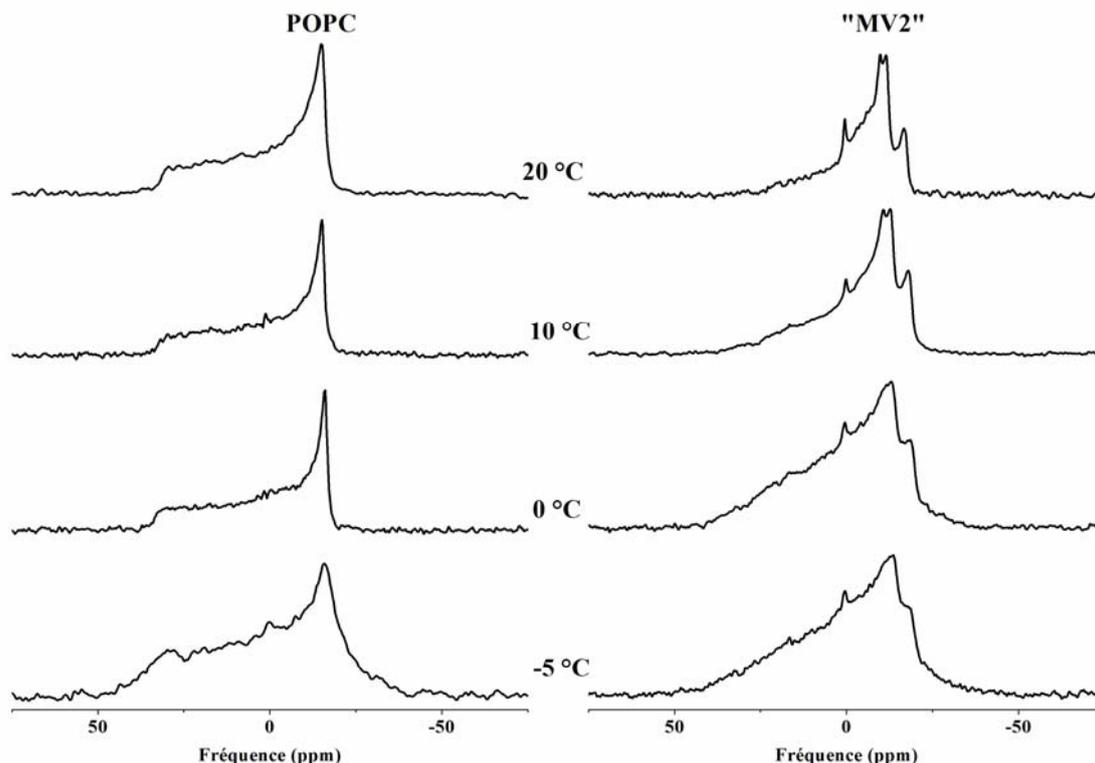


Figure IV-16 Spectres de RMN du phosphore pour les systèmes POPC, POPC/Chol/POPE/PI/POPS (MV2). Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeuté. Les températures sont indiquées au centre de l'image. Le mélange POPC/POPE/PI/POPS (MV2) est composé du ratio molaire de 30/20/25/20/5.

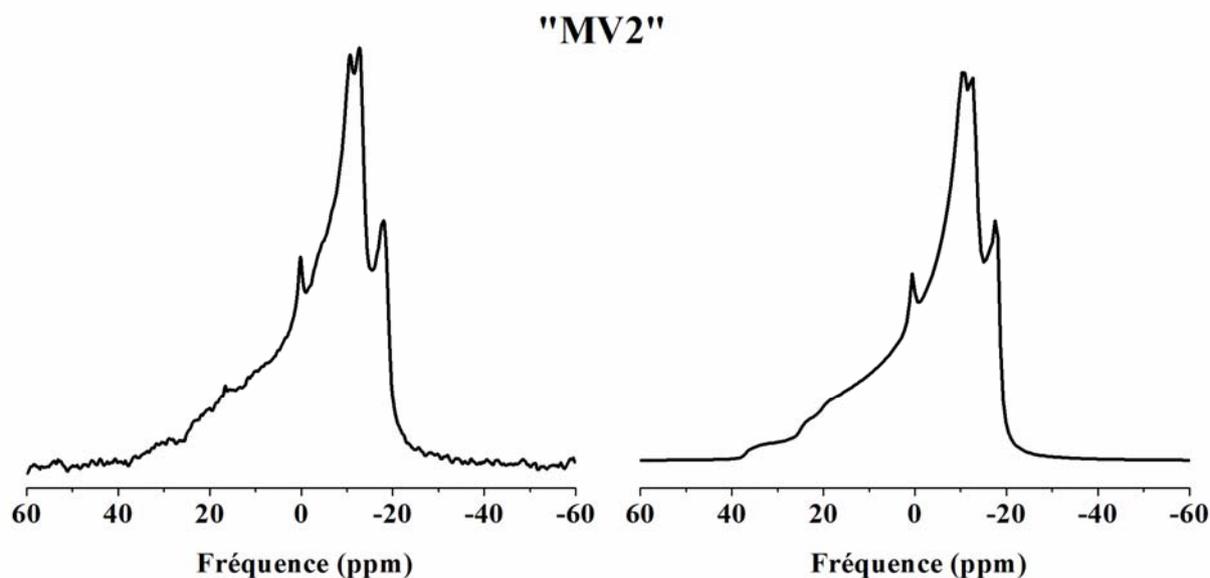


Figure IV-17 Comparaison entre le spectre expérimental (gauche) et le spectre simulé (droite) du système « MV2 » : POPC/Chol/PE/PI/5 30/20/25/20/5. La température est de 10°C. Les paramètres de simulation sont présentés dans les tableaux IV-8.

A 10°C et 20°C, les spectres obtenus présentent une symétrie axiale avec une diminution de la largeur spectrale. Nous observons deux massifs résultant de la superposition de quatre spectres de poudre correspondant à chacun des phosphores présents.

A 10°C, nous avons pu extraire trois valeurs de $\Delta\sigma$: -55 ppm, -38 ppm et -31 ppm. Nous avons également effectué une simulation d'un spectre RMN du phosphore pour ce système. Nous nous sommes appuyés sur la littérature pour attribuer les $\Delta\sigma$ de PE et PS. Nous avons attribué le massif possédant un $\Delta\sigma$ de -55 ± 2 ppm à PI et à PS. Nous avons précédemment déterminé un $\Delta\sigma$ de -60 ppm pour PI. Cependant, dans ce cas, nous sommes en présence de cholestérol. Le cholestérol est connu pour induire de l'ordre au niveau des chaînes lipidiques, mais aussi pour diminuer les anisotropies de déplacement chimique des phosphores. Ceci est dû au fait que le cholestérol s'intercale entre les lipides avec son groupement hydroxyle située au niveau des groupements carbonyles des chaînes lipidiques (Léonard et al., 2001). Ceci a pour conséquence d'augmenter l'espace entre les têtes polaires (on parle communément du rôle « espaceur » du cholestérol au niveau des têtes polaires) et donc les phosphores possèdent une liberté de mouvement plus importante, ce qui entraîne une diminution de l'anisotropie de déplacement chimique (Vist et Davis, 1990 ; Pott et al., 1995 ; Aussenac et al., 2003). Nous nous attendons donc à une diminution des $\Delta\sigma$ en présence de cholestérol. Nous avons mentionné que le massif présentant un $\Delta\sigma$ serait également associé à PS. Le $\Delta\sigma$ de PS a en effet été estimé aux alentours de -55/-58 ppm (Tilcock et Cullis, 1981 ; Bechinger, 2005). Le spectre de poudre avec un $\Delta\sigma$ de -38 ± 2 ppm est attribué à PC. En effet, le POPC pur a un $\Delta\sigma$ de -47 ppm tandis qu'en présence de PI il diminue à -42 ppm. En présence de cholestérol, nous nous attendons à une diminution supplémentaire de ce $\Delta\sigma$, ce qui correspondrait à la valeur de -38 ppm. PE possède un $\Delta\sigma$ au alentour de -43 ppm (soit plus faible que PC) (Tilcock et Cullis, 1981 ; Shin, 1995). Sur cette base, nous attribuons le $\Delta\sigma$ de -31 ppm à PE dont la présence de PI et de cholestérol induirait également une diminution du $\Delta\sigma$.

A partir de ces données, nous avons lancé une simulation de spectre RMN du phosphore (Figure IV-17). Les paramètres de simulation optimisés sont présentés dans le tableau IV-8. Ceci nous a permis de confirmer et d'affiner nos attributions, notamment pour PE (Tableau IV-9).

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
P n°1	-38	300	-1	0,30	1,25
P n°2	-31	300	-1	0,25	1,25
P n°3	-55	200	-0,4	0,20	1,25
P n°4	-51	300	0	0,05	1,25
Pic iso	0	200	0	0,01	1,25

Tableau IV-8 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système « MV2 » : POPC/Chol/PE/PI/PS 30/20/25/20/5. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C puis les paramètres ont été optimisés. T_2 est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome.

Lipides	$\Delta\sigma$ (ppm)
PC	-38±2
PE	-31±2
PI	-55±2
PS	-51±2

Tableau IV-9 Anisotropie de déplacement chimique du phosphore pour les systèmes POPC, POPC/POPE/PI/POPS (MV2). Le mélange POPC/POPE/PI/POPS (MV2) est composé du ratio molaire de 30/20/25/5. Les valeurs sont exprimées en ppm. L'erreur est estimée directement sur les spectres. Cette attribution est donnée pour une température de 10 °C.

IV.6 Etude préliminaire sur les membranes naturelles

Après avoir modélisé les vésicules membranaires MV1 et MV2, nous souhaitons travailler avec les membranes naturelles MV1 et MV2, afin de vérifier si nous observons les mêmes tendances.

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des modèles membranaires (liposomes) constitués de lipides extraits de la fraction MV0. Ceci permet de nous affranchir des protéines contenues dans ces membranes et de ne tenir compte que de la contribution lipidique au niveau des propriétés membranaires. De plus, bien que le but ultime de ce travail soit de travailler sur les vésicules « MV1 » et « MV2 », respectivement, nous avons d'abord travaillé sur la fraction MV0 (soit MV1 et MV2), que nous récupérons en quantité plus importante, afin d'optimiser les conditions de préparation. MV1 ne représente que 10% des MV0s (Collas et Poccia, 1996). Pour l'étude par RMN, nous avons besoin d'une quantité importante de MV1 et donc la préparation de telles quantités demande beaucoup de matériel de départ et du temps. Il est donc plus pertinent d'optimiser d'abord optimiser la méthodologie à partir de la fraction MV0.

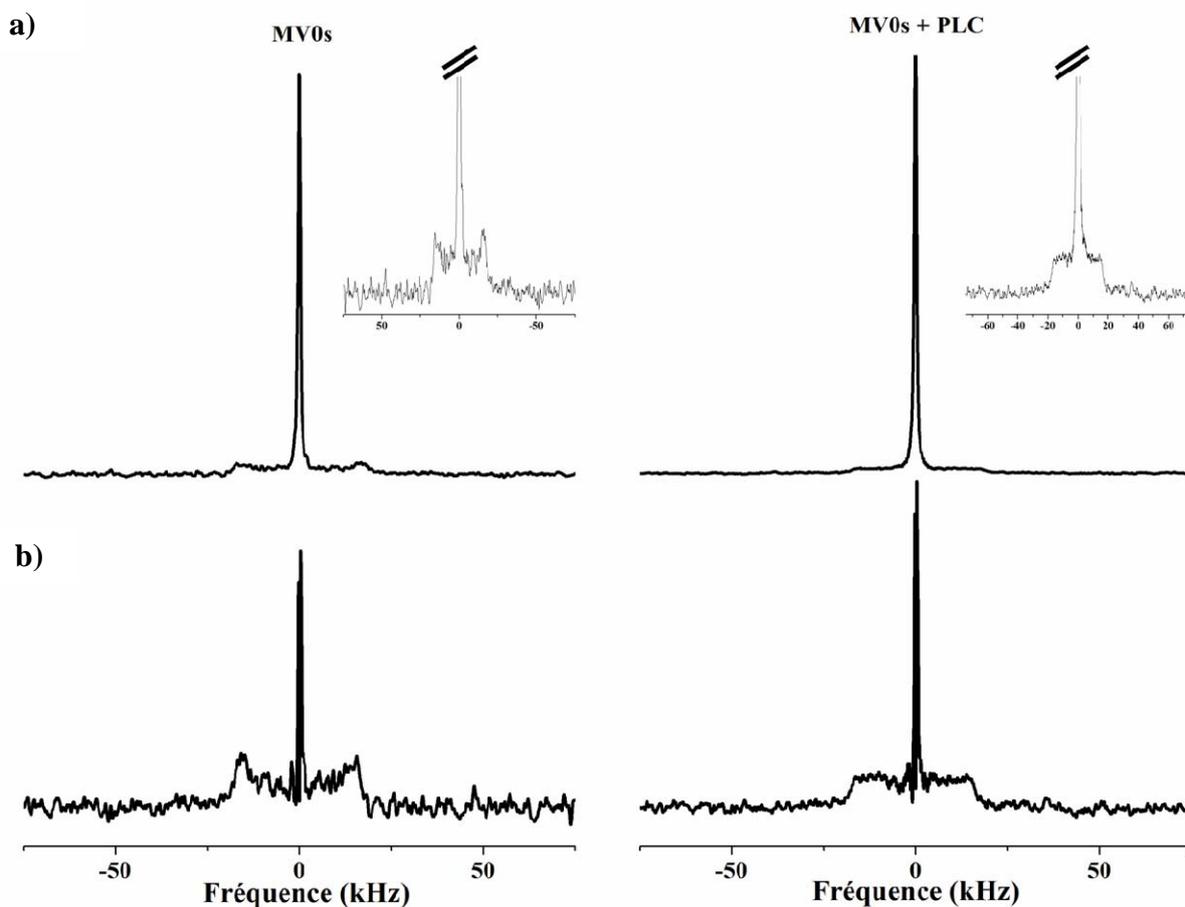


Figure IV-18 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes MV0s et MV0s + PI-PLC. Les échantillons sont hydratés dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutééré. Le système MV0s est une dispersion aqueuse préparée à partir des lipides extraits de la fraction MV0s. Le système MV0s + PI-PLC correspond à une dispersion aqueuse préparée à partir des lipides extraits de la fraction MV0s incubés avec PI-PLC. La température est de 10 °C. L'encart montre un zoom des spectres précédents. **b) Spectres résultant de la soustraction des spectres expérimentaux des systèmes MV0s et MV0s+PI-PLC avec un spectre isotrope simulé.** Le spectre isotrope a été simulé à l'aide de l'outil NMRsim du logiciel TOPSPIN (voir chapitre II).

	$\Delta\nu_Q$ (kHz)	$2*S_{CD}$
Extrait MV0s	36 ± 1	$0,57 \pm 0,02$
Extraits MV0s + PI-PLC	35 ± 1	$0,56 \pm 0,02$

Tableau IV-10 Eclatement quadrupolaire et Paramètre d'ordre des systèmes MV0s et MV0s + PI-PLC. L'erreur est estimée à +/- 1 kHz sur la mesure de l'éclatement quadrupolaire. La température est de 10 °C +/- 1 °C.

	Calcul sur FID		Simulation isotrope	
	Contribution « solide »	Contribution « isotrope »	Contribution « solide »	Contribution « isotrope »
Extrait MV0s	$53\% \pm 5\%$	$47\% \pm 5\%$	$50\% \pm 5\%$	$50\% \pm 5\%$
Extrait MV0s + PI-PLC	$30\% \pm 5\%$	$70\% \pm 5\%$	$25\% \pm 5\%$	$75\% \pm 5\%$

Tableau IV-11 Pourcentage de phase isotrope dans les systèmes MV0s et MV0s + PI-PLC. Estimation faite à partir de deux méthodes différentes : la méthode de Fenske et al . et la simulation de raie isotrope (voir chapitre II pour plus de détails).

Deux conditions ont été préparées : MV0s et MV0s+PI-PLC. Pour la première condition, nous avons récolté les vésicules MV0 (voir section IV.2.3 de ce chapitre), puis nous avons procédé à une extraction des lipides. Nous avons ensuite formé des liposomes à partir des lipides extraits de la fraction MV0 (condition contrôle). La deuxième condition a pour but d'étudier l'effet d'une phospholipase bactérienne spécifique à PI (PI-PLC). Nous savons qu'une étape essentielle de la formation de l'enveloppe nucléaire *in vitro* est l'hydrolyse PI-4,5-P₂ en DAG par PLC γ (Barona et al., 2005 ; Byrne et al., 2007). Nous souhaitons donc vérifier si nous observons un effet sur la dynamique du système après incubation avec PI-PLC (et donc formation de DAG). Pour cela, nous avons purifié les vésicules MV0s et nous les avons incubées avec PI-PLC. Les lipides ont été extraits puis nous avons fabriqué des liposomes avec ces derniers. Des études par RMN du deutérium et du phosphore ont été effectuées sur ces échantillons.

IV.6.1 Etude par RMN du deutérium des systèmes MV0s et MV0s+PI-PLC

a) Les spectres RMN du deutérium

Nous avons obtenu, après extraction et lyophilisation, 1 mg de lipides pour chaque échantillon. Afin de ne pas perturber l'environnement membranaire, nous avons incorporé une quantité minimale de POPC_{d31} soit 0,1 mg (Garnier-Lhomme et al., 2007). Etant donné le temps relativement conséquent pour les acquisitions, nous n'avons étudié qu'une seule température par échantillon soit 10 °C (température proche de la température physiologique des oursins).

Les spectres révèlent pour les deux conditions une partie lamellaire, que l'on devine à la base du spectre (voir la partie zoomée), et une contribution isotrope largement majoritaire (Figure IV-18). La contribution isotrope peut être attribuée soit à de l'eau (²H₂O : abondance naturelle) emprisonnée dans les vésicules, soit à la formation de vésicules de petites tailles. Afin de réduire le signal provenant éventuellement de l'eau piégée dans le système, nous avons de nouveau lyophilisé nos échantillons pour éliminer le maximum d'eau. Bien que cette contribution ait légèrement diminué, elle reste cependant très forte. Nous observons en comparant les spectres obtenus pour les systèmes MV0s et MV0s+PI-PLC que la contribution isotrope augmente après traitement avec PI-PLC.

b) Paramètres d'ordre et calcul du pourcentage de raie isotrope

Afin d'obtenir des informations sur la dynamique du système, nous avons mesuré les éclatements quadrupolaire au niveau de la région « plateau », permettant d'accéder au paramètre d'ordre S_{CDplateau} (Tableau IV-10). Nous obtenons des valeurs de paramètre d'ordre

de $0,57 \pm 0,02$ pour le système contenant les lipides extraits de MV0s et $0,56 \pm 0,02$ pour le système des lipides extraits de MV0s + PI-PLC. La différence entre ces deux valeurs n'est pas significative puisqu'elle se situe dans l'incertitude de mesure.

Comme mentionné précédemment, les spectres comportent une forte contribution isotrope pour les deux systèmes étudiés. Il apparaît intéressant de la quantifier. En effet, l'incubation de MV0s avec PI-PLC forme à partir de PI du DAG (Larijani et al., 2001 ; Byrne et al., 2005), lipides connus pour induire des phases non lamellaires (Basanez et al., 1996; Goñi and Alonso, 1999). Une proportion non négligeable de phase isotrope pourrait donc provenir de la formation de DAG pour l'échantillon incubé avec PI-PLC. Nous avons alors quantifié la partie isotrope des deux conditions à l'aide de deux méthodes différentes (voir chapitre II).

La première quantification est faite directement sur la FID du signal d'après la méthode de Fenske (Fenske et al., 1994). A partir de ces calculs, nous avons déterminé que la contribution isotrope est de 47 ± 5 % pour la condition MV0s et augmente à 70 ± 5 % pour l'échantillon traité avec PI-PLC (Tableau IV-11).

La deuxième méthode consiste à simuler un spectre isotrope à, puis de le soustraire à notre spectre expérimental. Nous avons déterminé un pourcentage de phase isotrope de 50 ± 5 % pour l'échantillon MV0s et un pourcentage de 75 ± 5 % pour l'échantillon MV0s+PI-PLC. Ces résultats sont en accord avec ceux déterminés par la méthode de Fenske.

Bien que le signal sur bruit de nos spectres soit très faible (pour la contribution solide), nous observons, qu'après traitement avec PI-PLC, la contribution isotrope augmente de 25 %, ce qui indique la formation d'objets non-lamellaires.

IV.6.2 Etude par RMN du phosphore

Afin de compléter l'étude sur les modèles MV0s, nous nous sommes tournés vers la RMN du phosphore. Dans les deux cas, nous sommes clairement en présence d'une phase lamellaire. Contrairement aux spectres de deutérium, nous n'avons pas de contribution isotrope majoritaire (nous regardons les mêmes échantillons qu'utilisés pour la RMN du deutérium). Ceci laisse alors supposer qu'une grande proportion de la contribution isotrope observée en deutérium proviendrait du signal de l'eau et n'implique pas des phases isotropes de POPC (que l'on observerait par RMN du phosphore). Cependant, nous constatons une augmentation de 5 ± 2 % de la contribution isotrope après traitement avec PI-PLC. Ceci va dans le même sens que ce qui a été observé en deutérium, mais dans une proportion moindre.

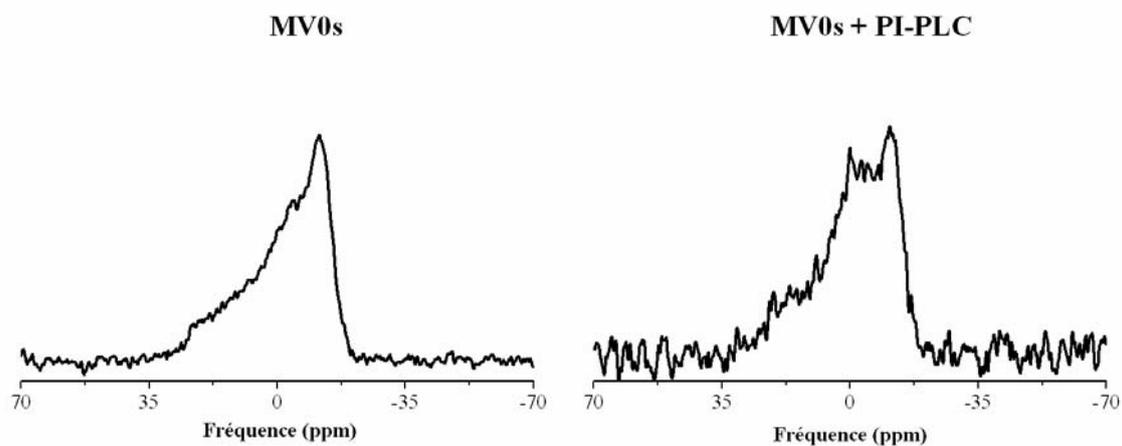


Figure IV-19 Spectres de RMN du phosphore des systèmes MV0s et MV0s + PI-PLC. Les échantillons sont hydratés dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutééré. Le système MV0s est une dispersion aqueuse préparée à partir des lipides extraits de la fraction MV0s. Le système MV0s + PI-PLC correspond à une dispersion aqueuse préparée à partir des lipides extraits de la fraction MV0s traités avec PI-PLC. La température est de $10^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ces spectres sont difficiles à exploiter plus en détails en raison d'un grand nombre de contributions se recouvrant. En effet, ces spectres résultent de la superposition des spectres de poudres de tous les phospholipides présents dans MV0s comme PC, PE, PS mais aussi PI, PIP, PIP₂ et PIP₃ pour les majoritaires. Nous pouvons néanmoins mesurer le CSA de la contribution la plus intense sur chacun des spectres. Nous obtenons un CSA de -36 ± 5 ppm pour les deux conditions. Nous pouvons supposer que ce CSA est celui de PC présent en quantité majoritaire dans MV0s et dont la valeur coïncide avec celle de PC en présence de phosphoinositides. De plus, nous devinons à la base du pic d'orientation 90° un épaulement qui serait attribué au PPIs présent en faible quantité lorsque l'on considère MV0s. En effet, les phosphoinositides sont fortement enrichis dans MV1, seulement MV1 ne représente que 10% de MV0s.

Ces résultats ont permis de montrer que les modèles constitués de lipides extraits de MV0s sont des phases lamellaires. Après traitement de MV0s avec PI-PLC γ , nous observons une augmentation de la contribution isotrope aussi bien en deutérium qu'en phosphore indiquant une augmentation d'objets non-lamellaires. Ces résultats sont bien entendu préliminaires et à prendre avec précaution, mais semblent prometteurs.

IV.7 Discussion

Ces études ont permis d'étudier l'effet des PPIs dans des membranes modèles mimant la composition lipidique des vésicules MV1. Plusieurs résultats majeurs ont été obtenus. Premièrement, nous avons déterminé que les PPIs, sauf PIP₃, engendrent une forte fluidité membranaire.

	Zone de transition de phase observée	$2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ à 10°C	$2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ à 20°C	Effet fluidifiant sur POPC
POPC	oui (-5 °C)	0,36±0,01	0,33±0,01	-
POPC/PI 60/40	non	0,31±0,01	0,28±0,01	oui
POPC/PI 20/80 ^a	non	0,27±0,01	0,24±0,01	oui
POPC/PI 10/90 ^b	non	0,28±0,03	nd	oui
POPC/PIP 62/37	non	0,31±0,01	0,29±0,01	oui
POPC/PIP 10/90 ^b	non	0,32±0,03	nd	oui
POPC/PIP ₂ 70/30	oui (-5 °C)	0,30±0,01	0,25±0,01	oui
POPC/PIP ₂ 10/90 ^b	oui (-5 °C)	0,32±0,03	nd	oui
POPC/PI/PIP ₂ 49/32/19	oui (-5 °C)	0,36±0,01	0,31±0,01	non
POPC/PIP ₃ 80/20	oui (-5 et 0 °C)	0,40±0,02	0,38±0,01	non
POPC/PI/PIP ₃ 52/34/14	oui (-5 °C)	0,26±0,01	0,23±0,01	oui

Tableau IV-12 Tableau récapitulatif des paramètres d'ordre $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ mesurés pour les différents systèmes étudiés. nd : non déterminés. ^a:données issues de Larjani et Dufourc, 2006. ^b : données issues du chapitre III. L'erreur de mesure sur les échantillons PC/PIs 10/90 plus importante résulte d'un faible rapport signal/bruit. En effet, seulement 0,1 mg de POPC_{d31} a été utilisé dans ces cas.

	$\langle 2S_{CD} \rangle_{chaîne}$ à 10°C	$\langle 2S_{CD} \rangle_{chaîne}$ à 20°C	Effet fluidifiant sur POPC
POPC	0,36±0,01	0,33±0,01	-
POPC/PI/PIP/PIP ₂ 38/25/22/15	0,30±0,01	0,26±0,01	oui
« MV1 »	0,32±0,01	0,29±0,01	oui
« MV2 »	0,42±0,02	0,37±0,02	non

Tableau IV-13 Tableau récapitulatif des paramètres d'ordre $\langle 2S_{CD} \rangle_{chaîne}$ pour les différents systèmes étudiés. « MV1 » : POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/20/18/12/8. « MV2 » : POPC/Chol/PE/PI/PS 30/20/25/20/5.

Deuxièmement, ces mêmes lipides contrôlent l'orientation de la tête polaire des PC. Nous avons également déterminé que le modèle « MV1 » présente une forte fluidité membranaire, résultant d'un effet complexe d'ordre et de désordre des PPIs, tandis que le modèle « MV2 » présente un ordre important comparé au modèle « MV1 » (Récapitulatif des résultats dans les tableaux IV-12 et IV-13). Tous ces points vont faire l'objet de la discussion et une implication biologique de ces résultats sera présentée.

IV.7.1 Propriétés structurales et de dynamiques de membranes enrichies en phosphoinositides (MV1)

a) Dynamique membranaire en présence des PPIs

Nous avons constaté que PI, PIP et PIP₂, à des ratios de PC/PI 30/20, PC/PIP 30/18 et de PC/PIP₂ 30/12, induisent une fluidification importante de la membrane sur toute la gamme de températures étudiées (illustration à 10 °C et 20 °C dans le Tableau IV-12). Au contraire, PIP₃ induit une augmentation de l'ordre comparé au système POPC seul dès 0 °C. A basse température, des différences significatives entre les lipides ont été observées. En effet, PI et PIP abolissent la transition de phase dans la gamme de températures étudiées. A -5 °C, les systèmes PC/PIP₂ et PC/PIP₃ se trouve dans la zone de transition de phase. Contrairement à PI et à PIP, ces lipides favoriseraient la formation de la phase gel à basse température.

Ces résultats montrent que l'effet des PPIs dans la membrane est plus complexe que celui attendu en première approximation.

❖ Effet des PPIs sur la fluidité membranaire

L'effet fluidifiant de PI avait déjà été observé à des ratios différents et avait été attribué à un effet combiné de la tête polaire du lipide de taille importante ainsi qu'à la présence d'insaturations dans la chaîne *sn2* de PI, abaissant alors la transition de phase du système et augmentant la fluidité de celui-ci (Larijani et Dufourc, 2006). Les PIP et PIP₂ étudiés possèdent les mêmes chaînes insaturées ainsi qu'une tête polaire de taille importante, ce qui expliquerait alors également l'effet fluidifiant de ces derniers. Bien que la contribution en lipides soit plus faible que dans le système PC/PIP₂ (30% de PIP₂ contre 35-40% de PI et PIP), nous obtenons un effet fluidifiant du même ordre de grandeur (Tableau IV-12). Ceci signifie un pouvoir fluidifiant plus prononcé de PIP₂ dans cette gamme de concentration.

Il est, par ailleurs, important de noter que l'effet fluidifiant de PI dépend de la concentration de PI (effet dose dépendante) (Tableau IV-12). Ce phénomène est illustré par la figure IV-20.

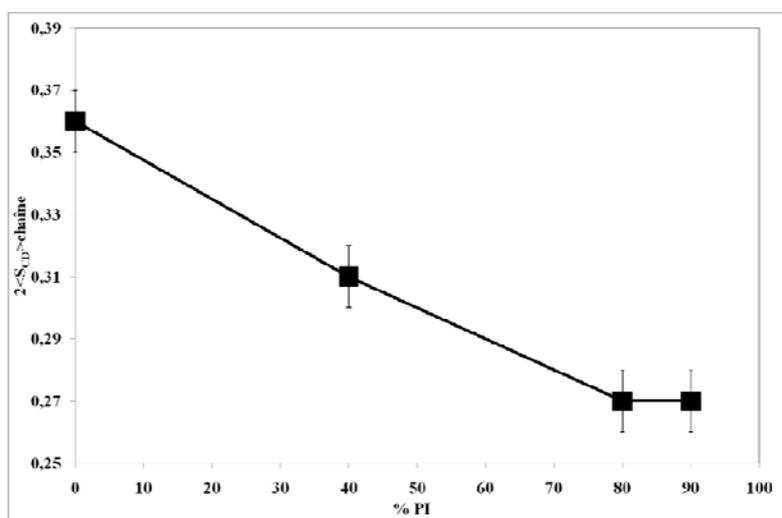


Figure IV-20 Etude de l'effet dose dépendante de PI. Variation des paramètres d'ordre globaux de la chaîne lipidique en fonction de la concentration en PI dans la membrane. Les mesures ont été effectuées à 10 °C. L'erreur sur les paramètres d'ordre est estimée à $\pm 0,02$.

Nous constatons néanmoins un effet seuil à partir de 80% de PI. Cet effet dose dépendant n'est pas observé pour PIP et PIP₂ dans la gamme de concentration étudiée (entre 40/30 % et 90 % molaire de ces lipides), puisque les paramètres d'ordre obtenus pour ces concentrations sont similaires (Tableau IV-12). Ceci laisse supposer un effet seuil de fluidification dès 40 % pour PIP et dès 30 % pour PIP₂. De plus, la fluidité maximale engendrée par PIP et PIP₂ est plus faible que celle observée pour PI. En effet, les paramètres d'ordre obtenus pour le système PC/PIP et PC/PIP₂, fortement enrichis en PPIs, sont similaires à ceux obtenus pour le système POPC/PI 60/40 (Tableau IV-12). Ceci est surprenant puisque ces lipides ne présentent pas la même charge (Tableau IV-12). PI comporte une charge négative. Au pH étudié (pH 7,2), le phosphomonoester de PIP porte deux charges négatives ($pK_{a2}=6,3$: Van Paridon et al., 1986), ce qui implique que PIP porte trois charges négatives (le pK_a du glycérophosphate vaut 3 : Van Paridon et al., 1986). La charge de PIP₂ a été estimée à -4 à pH 7 (Kooijman et al., 2009). Nous constatons alors que l'augmentation de la taille de la tête polaire et de la charge du lipide n'influence pas de manière significative la dynamique des chaînes lipidiques.

Ceci pourrait s'expliquer par la faculté de ces lipides de former des liaisons hydrogène entre eux, contrebalançant ainsi l'effet de désordre dû aux charges et induisant la formation de domaines enrichis en PPIs dans des membranes de PC (Carrier et Wong, 1996 ; Liepina and al., 2003 ; Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005 ; Levental et al., 2008a ; Levental et al., 2008b ; Kooijman et al., 2009 ; Lupyan et al., 2010). Nos spectres de RMN du deutérium des différents systèmes en phase fluide ne montrent pas de caractères diphasiques, indiquant l'absence de domaines dont la vitesse d'échange serait lente dans ces

membranes. Cependant, nous ne pouvons exclure la présence de deux domaines fluides dont l'échange serait rapide à l'échelle de temps de la RMN (et donc non observés par RMN). Dans ce cas, les spectres RMN informeraient sur l'environnement moyen perçu par POPC. Les domaines enrichis en PPIs seraient plus stables, plus le phosphoinositide considéré est phosphorylé (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005), indiquant que l'introduction d'un (deux ou trois) groupement(s) phosphomonoester au sein de la molécule est donc une source supplémentaire de stabilisation malgré l'augmentation de la charge du lipide. Nous pourrions expliquer nos résultats par le fait que PIP (PIP₂) formerait un réseau de liaisons hydrogène plus importants que PI, induisant alors une diminution plus importante de la diffusion latérale des molécules au sein de la membrane. Cet effet semble plus marqué dans le système POPC/PI/PIP₂, pour lequel nous avons observé un effet d'ordre par rapport aux systèmes PC/PI et PC/PIP₂ (ordre équivalent au système POPC), malgré l'ajout d'un lipide chargé (Tableau IV-12). Ceci est difficilement explicable car on s'attendait à un effet de désordre. Un cluster de PI/PIP₂ est peut-être formé dans lequel un réseau plus important de liaisons hydrogènes est formé.

L'effet d'ordre observé pour PIP₃ apparaît, tout d'abord, surprenant du fait de la présence d'insaturations sur la chaîne *sn2* de PIP₃, de la taille importante de la tête polaire (cycle inositol portant trois groupement phosphate), ainsi que de sa forte charge négative (charge de -5 estimée par Kooijman et al., 2009). En effet, ces contributions auraient tendance à augmenter la fluidité du système (comme observé pour PI, PIP et PIP₂). Nous pouvons de nouveau supposer la formation d'un domaine enrichi en PIP₃ fortement stabilisé par liaisons hydrogène dans lequel la diffusion latérale des molécules a diminué (augmentation de l'ordre). Le système PC/PI/PIP₃ (30/20/8) a une dynamique globale plus importante (plus faible que celle observée pour le système POPC/PI) à partir de 10 °C (Tableau IV-12). En présence de PI et PIP₃, il semblerait que la présence de PI sur un mélange POPC/PIP₃ déstabilise l'effet d'ordre observé pour ce système, soit le contraire de ce que nous avons observé pour PI et PIP₂. La présence de PI déstabiliserait le réseau de liaisons hydrogène entre les PIP₃ et la répulsion électrostatique prédominerait induisant une augmentation de la dynamique.

❖ Effet des PPIs sur la transition de phase

Nous avons observé que PI et PIP abolissent la transition de phase dans la gamme de températures étudiées, ce qui n'est pas le cas de PIP₂ et PIP₃ (Tableau IV-12). Ceci pourrait de nouveau s'expliquer par le fait que PIP₃ et PIP₂ posséderaient une faculté plus importante à se regrouper en domaines que PIP et PI en raison d'une stabilisation plus forte par liaisons

hydrogène (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005). Ceci engendrerait une séparation de phase plus prononcée avec une zone riche en POPC contenant peu de PIP₃ ou de PIP₂ dans les systèmes POPC/PIP₃ et POPC/PIP₂. Dans ce cas, la transition de phase de POPC serait donc de nouveau observée. Dans le cas des systèmes POPC/PI et POPC/PIP, nous pouvons supposer que comme la séparation de phase serait moins effective (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005) et que la concentration étudiée est plus importante, une quantité non négligeable de PI et PIP reste dans la zone de POPC induisant ainsi l'abolition de la transition de phase dans la gamme de températures étudiées. Ceci concorde bien avec nos observations. Nous avons également constaté que la zone de transition de phase est plus étendue pour le système POPC/PIP₃ que pour les systèmes POPC/PIP₂ et POPC seul. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les PIP₃ contenus dans la zone riche en POPC forment des liaisons hydrogène de manière plus prononcées que PIP₂, induisant ainsi une diminution de la diffusion latérale des molécules. Les systèmes PC/PI/PIP₂ et POPC/PI/PIP₃ présentent une zone de transition de phase à -5 °C. PIP₂ et PIP₃ conserveraient donc cette faculté sur un mélange POPC/PI.

b) Effet des PPIs sur la dynamique à l'interface de la membrane

Nous avons observé que les anisotropies de déplacement chimique des PPIs restent inchangées que l'on soit dans un système pur ou bien mixte avec PC. En effet, nous retrouvons des $\Delta\sigma$ de l'ordre de -60 ppm pour le phosphodiester, de -15 ppm pour le phosphomonoester P4 et de -3 ppm pour les phosphomonoester P5 pour tous nos systèmes, $\Delta\sigma$ équivalents à ceux déterminés dans le chapitre III dans le cas des systèmes purs. Nous avons également constaté que l'anisotropie de déplacement chimique de PC diminue de -47±1,5 à -35-40± 1,5 ppm en présence des PPIs, traduisant ainsi une augmentation de la dynamique comme mentionné précédemment et de l'orientation des têtes polaires. Cette diminution est, par ailleurs, plus prononcée en présence de PIP et de PIP₂ que par rapport à PI.

Nos résultats indiquent que la dynamique et l'orientation des PPIs ne sont pas modifiées par la présence de PC, et qu'ils imposent l'orientation de la tête polaire des PC et ceci de manière plus marquée pour PIP et pour PIP₂. Ceci laisse de nouveau supposer un regroupement en domaines de ces lipides dans la membrane de POPC.

c) Modèle « MV1 »

Le système PC/PI/PIP/PIP₂ (30/20/18/12), qui se rapproche de la composition lipidique des vésicules MV1, représente une membrane très fluide, ce qui implique un effet combiné fluidifiant de PI, PIP et PIP₂. Le réseau de liaisons hydrogène, mentionné précédemment, serait affaibli en raison de la forte concentration de charges et par conséquent,

l'effet de désordre est observé. Cet effet est du même ordre que celui observé pour le système POPC/PI (Tableau IV-13). Nous observons néanmoins toujours une séparation de phase gel et de phase fluide à basse température, indiquant que l'effet de PIP₂, à basse température, est conservé.

Nous avons ensuite fabriqué une membrane modèle mimant la composition lipidique présente dans MV1. Ce modèle est composé de POPC, PI, PIP, PIP₂ et PIP₃ avec des ratios molaires de 30, 20, 18, 12 et 8 respectivement (cf Figure IV-1). A basse température, notre système devient diphasique puisque nous observons une phase gel et une phase fluide. Sur la base des précédents résultats, nous pouvons facilement supposer que cet effet est dû à la présence de PIP₂ et PIP₃ qui montre une tendance claire à se séparer de POPC à basse température et ce même en présence de PI et de PIP.

Ce modèle de membrane présente également une dynamique très importante au niveau des chaînes d'acide gras à 10 °C et à 20 °C. En effet, si l'on compare les paramètres d'ordre de notre modèle MV1 à ceux obtenus pour le modèle composé uniquement de POPC (contrôle), nous obtenons des valeurs plus faibles, traduisant bien une augmentation de la fluidité de la membrane (Tableau IV-13). Ceci serait dû à un effet combiné complexe de fluidification et de rigidification des phosphoinositides présents dans ce modèle. On a donc démontré que la présence des PPIs, dans les mêmes proportions que celles retrouvées dans les vésicules MV1, augmente la fluidité des membranes.

Nous avons mentionné que le spectre phosphore du modèle « MV1 » à 10 °C est essentiellement isotrope avec une contribution large à la base des spectres. Sur la base seule de cette constatation, nous aurions pu en déduire que notre système est en phase « isotrope », mais la RMN du deutérium nous informe que nous sommes en phase lamellaire. Ce résultat pourrait donc s'expliquer par la présence de trois nouveaux phosphores très mobiles sur le cycle inositol de PIP₃ (qui viennent s'ajouter à ceux de PIP et PIP₂). La grande mobilité de ces phosphores peut induire des pics étroits intenses qui domineraient les contributions solides, comme nous l'avons déjà constaté pour les systèmes contenant notamment PIP₂ et PIP₃.

d) Modèle « MV2 »

Contrairement aux vésicules MV1, les membranes MV2 présentent les caractéristiques d'une membrane plus classique (dans le sens plus proche des membranes plasmiques bien étudiées) dont les lipides majoritaires sont le PC, la PE et le cholestérol. Nous savons que ces membranes représentent environ 90 % de la fraction totale MV0s et par conséquent représentera l'élément constitutif majeur de l'enveloppe nucléaire (Collas et Poccia, 1996 ;

Larijani et Poccia, 2007). Afin de comparer les propriétés membranaires de MV1 et de MV2, nous avons donc construit un modèle pour MV2.

Nous avons observé que le modèle MV2 se trouvait dans une phase liquide ordonnée, caractérisée par un ordre important (Tableau IV-13). Nous avons précédemment montré que le modèle de MV1 est beaucoup plus fluide que POPC pur. Si nous comparons les paramètres d'ordre de ces deux modèles, nous observons clairement que MV1 est beaucoup plus fluide que MV2.

Nous savions déjà que MV1 et MV2 différaient fortement en termes de composition lipidique et protéique et dans leur contribution à leur formation de l'enveloppe nucléaire (Byrne et al. 2009). Dans ce chapitre, nous avons montré que ces membranes différaient également au niveau de la fluidité membranaire et donc au niveau de leur faculté à initier la fusion nécessaire à la formation de l'enveloppe nucléaire.

e) Un pas vers l'étude des membranes naturelles

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des modèles membranaires formés de lipides extraits des vésicules MV0 (MV1 et MV2). Afin d'obtenir suffisamment de vésicules MV1 pour l'étude par RMN, il faut une quantité de MV0s très conséquente et il est donc apparu pertinent d'optimiser les conditions de préparations de ces modèles à partir des vésicules MV0s obtenues en quantité beaucoup plus importante.

Nos spectres de RMN du deutérium ont montré une contribution isotrope de 50% dans l'échantillon contrôle. Cependant, les spectres de RMN du phosphore ne montrent qu'une phase lamellaire. Cette phase isotrope ne proviendrait donc pas de petits objets formés avec du POPC ni d'une dégradation. Plusieurs lyophilisations ont été effectuées afin d'enlever le maximum d'eau éventuellement piégée dans notre système, mais ceci n'a pas été concluant.

Nous avons ensuite travaillé sur un modèle membranaire formés avec de lipides extraits des vésicules MV0s, préalablement incubées avec PI-PLC. Nous avons observé une augmentation du pourcentage de phase isotrope. Ceci impliquerait la formation d'objet non-lamellaire. PI-PLC hydrolyse PI en DAG. Il a déjà été mentionné que DAG a la faculté de former des objets non-lamellaires et de promouvoir la fusion membranaire (Basanez et al., 1996; Goñi and Alonso, 1999). Bien que des étapes d'optimisation sont visiblement nécessaires, ce premier résultat semble prometteur et indique qu'il serait possible de suivre le changement de dynamique membranaire au sein des vésicules MV1 suite à l'incubation avec PI-PLC, soit avant et après le déclenchement de la formation de l'enveloppe nucléaire.

IV.7.2 Implications biologiques des résultats

Les vésicules MV1 sont des composantes essentielles dans la formation de l'enveloppe nucléaire, notamment dans les processus de fusions membranaires nécessaires (Collas et Poccia, 1996). Cette population de membrane est enrichie à plus de 60% en phosphoinositides (Byrne et al. 2007). La question qui s'est donc posée, a été : Quel serait l'implication d'une telle composition lipidique dans les propriétés fusogènes de MV1 ?

Nos résultats ont montré que les modèles membranaires mimant la composition lipidique des vésicules MV1 présentent une importante fluidité membranaire, provenant d'un effet complexe de fluidification et de rigidification des différents PPIs. Comme nous l'avons mentionné précédemment la fluidité membranaire est un paramètre extrêmement important dans le cas de la fusion. En effet, les mécanismes de fusion membranaire impliquent de fortes déformations de la membrane (Chernomordik, 1996 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008) et une membrane fluide aura plus de facilité qu'une membrane rigide à se déformer afin de former les intermédiaires de fusion. Les vésicules MV1 aurait une épaisseur de membrane plus faible qu'une membrane de type classique en raison de sa plus grande fluidité (Douliez et al., 1995 ; Douliez et al., 1996). Ceci implique qu'elles auraient donc plus de facilité à se déformer (Helfrich, 1974 ; Méléard et al., 1997 ; Rawicz et al., 2000 ; Marsh, 2006). La présence des PPIs au sein des vésicules MV1 permettrait donc de préparer la membrane aux mécanismes de fusion en augmentant la fluidité membranaire (et donc sa propension à se déformer). Du fait de leur effet complexe de fluidification/rigidification (par exemple PIP₃ induit de l'ordre), nous pouvons envisager que des variations de la concentration de ces lipides, pourraient moduler la propension à la fusion de ces membranes.

Comme nous l'avons vu lors de l'étude du polymorphisme des phosphoinositides (chapitre III), les PPIs sont des lipides à fort potentiel inducteur de courbure positive et plus particulièrement PIP₂ et PIP₃. Nous savons que l'hydrolyse de PIP₂ en DAG par PLC γ déclenche les processus de fusion (Byrne et al., 2007). La formation de DAG, lipides à courbure spontanée fortement négative, permettrait de stabiliser la formation du « stalk » de fusion (Basanez et al., 1996 ; Goñi et Alonso, 1999 ; Villar et al., 2000 ; Villar et al., 2001). Une fois cette étape accomplie, nous pouvons également envisager que les phosphoinositides présents dans les vésicules MV1, du fait de leur courbure spontanée positive, participeraient aux processus de fusion membranaire en facilitant l'ouverture du pore de fusion (Zimmerberg

et al., 1993 ; Chernomodik, 1996 ; Basanez, 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). Du fait que PIP₂ et PIP₃ ont la plus forte courbure positive, nous pouvons envisager que des variations en concentration de ces lipides pourrait influencer sur les processus de fusion. Il est important de rappeler que nos études laissent envisager la formation de domaines enrichis en PPIs. Ces domaines seraient alors à forte courbure positive et chargés négativement et pourraient faciliter le recrutement de protéines impliquées dans les processus de fusion.

IV.8 Conclusion

Ce chapitre avait pour but de déterminer si les propriétés fusogènes de MV1 pouvaient être liées à l'enrichissement de ces vésicules en phosphoinositides. Nous avons donc construit plusieurs modèles membranaires permettant d'étudier les effets des phosphoinositides et de comparer ces modèles enrichis en PPIs à d'autres de composition lipidique plus commune. Ces études ont permis dans un premier temps de mettre en évidence des effets complexes des différents phosphoinositides. De plus, nous avons montré une augmentation significative de la fluidité dans le modèle mimant la composition lipidique des vésicules MV1 en raison de la présence des PPIs. Cette augmentation de la fluidité ainsi que la nature des PPIs à induire des membranes à courbure positive rendraient les membranes MV1 extrêmement fusogènes.

V. Etudes des portions rémanentes de l'enveloppe nucléaire (NERs), riches en cholestérol et en phosphoinositides, essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire

V.1 Introduction

Lors de la fécondation, l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde se disloque partiellement et des portions de l'enveloppe nucléaire sont retenues à chaque pôle du noyau du spermatozoïde. Ces portions de membranes sont appelés les NERs (pour « Nuclear Envelope Remnants »). Les NERs ont été observés *in vivo* chez de nombreux organismes et notamment chez les oursins (Longo et al. 1968). Les NERs ont également été observés *in vitro* après solubilisation de l'enveloppe nucléaire par un détergent (Triton X-100) (Collas et Poccia, 1995). Ils sont ensuite incorporés dans la nouvelle enveloppe nucléaire formée aussi bien *in vivo qu'in vitro* (Longo et al., 1968 ; Collas et Poccia, 1995). L'ablation des NERs empêche toute formation de l'enveloppe nucléaire. De plus, ils dirigent l'arrimage de deux populations de vésicules membranaires de l'œuf fécondé puis fusionnent avec celles-ci afin de former l'enveloppe nucléaire (Collas et Poccia, 1995). Ceci montre que les NERs sont bien un compartiment membranaire actif et primordial pour la formation de l'enveloppe nucléaire dans le système *in vitro* (Collas et Poccia, 1995 ; Garnier-Lhomme et al., 2009).

L'analyse de la composition lipidique de ces membranes a révélé que les NERs sont fortement enrichis en cholestérol (42 % molaire des lipides totaux) et en phosphoinositides (30% molaire des lipides totaux soit environ 52% molaire des phospholipides) (Figure V-1 : Garnier-Lhomme et al., 2009). De plus, l'analyse de la composition en acide gras des chaînes lipidiques a révélé que nous sommes essentiellement en présence de lipides polyinsaturés sur la chaîne *sn2*. Cette composition lipidique est surprenante et n'a jamais été rencontré précédemment. Le cholestérol est trouvé dans de nombreuses membranes biologiques. On le retrouve souvent dans des proportions équimolaires avec les phospholipides et est considéré comme un régulateur de dynamique membranaire (Faure et al., 1996 ; Dufourc, 2008). Ce qui est inhabituel dans notre cas, c'est que le cholestérol est fortement enrichi dans une membrane dont la moitié des phospholipides sont des phosphoinositides, lipides que l'on retrouve le plus souvent en faible proportion dans les membranes (Di Paolo et De Camilli, 2006). Il a été montré qu'une telle membrane reste relativement fluide bien qu'en phase liquide ordonnée (Garnier-Lhomme et al., 2009). De part ces constatations, plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer leur participation dans la formation de l'enveloppe nucléaire. Il est avancé que la présence d'une importante quantité de cholestérol conférerait la propriété de résistance aux détergents observée pour les NERs, par analogie aux membranes résistantes aux détergents dont il a été montré un enrichissement en cholestérol (London et Brown, 2000).

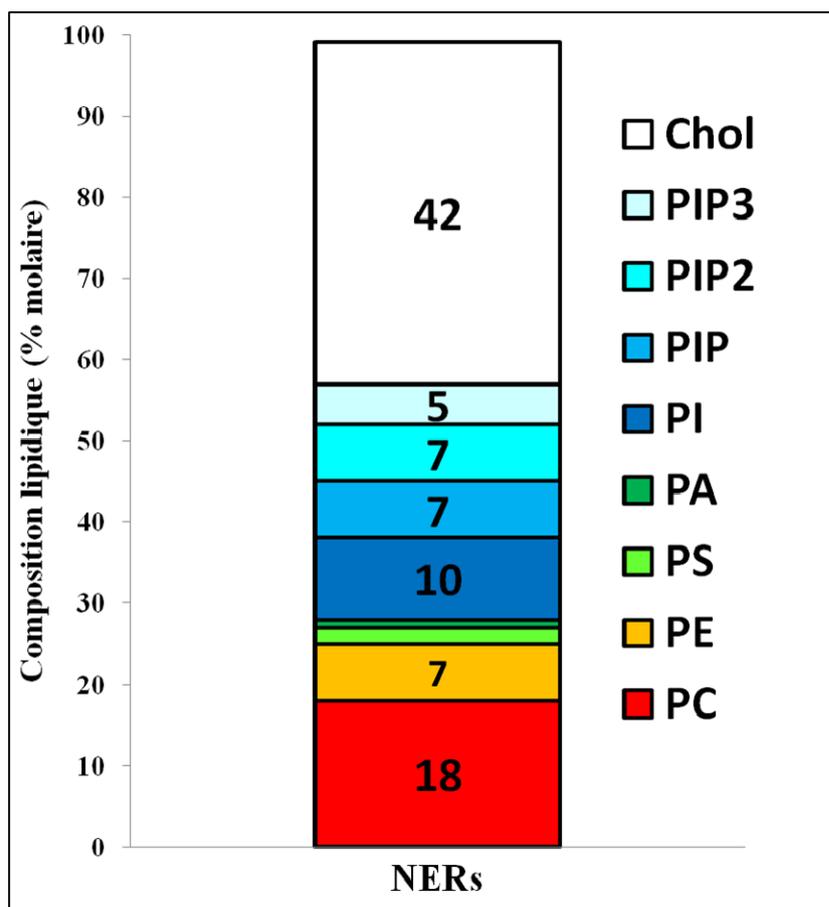


Figure V-1 Composition en lipides des NERs (adapté Garnier et al., 2009). Les phospholipides ont été extraits puis ont été analysés par HPLC-ESI-MS/MS. Les données sont exprimées en pourcentage molaire par rapport à la quantité totale en lipides (moyenne \pm SEM avec $n = 3$ ou 4). Le cholestérol a été déterminé par colorimétrie.

HPLC-ESI-MS/MS: chromatographie liquide haute pression-ionisation à électrospray puis spectrométrie de masse en tandem; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyléthanolamine; PS : phosphatidylsérine ; PA:phosphatic acide ; PI: phosphatidylinositol; PIP: phosphatidylinositol monophosphate; PIP₂: phosphatidylinositol biphosphate; PIP₃: phosphatidylinositol triphosphate.

	Chaîne lipidiques	ratio molaire					
POPC	16:0; 18:1	58	28	28	28	28	28
Chol	-	42	42	42	42	42	42
PI ^a	18:0;20:4 ^b		30	23	23	16	11
PIP ^a	18:0;20:4 ^b			7		7	7
PIP ₂ ^a	18:0;20:4 ^b				7	7	7
PIP ₃	18:0;20:4 ^b						5

Tableau V-1 Composition lipidique (ratio molaire) des différents modèles fabriqués pour étudier les propriétés de NERs. a: lipides naturels extraits du foie de bœuf pour PI, et du cerveau de porc pour PIP et PIP₂ (Avanti polar Lipids). b: chaîne prédominante de l'extrait (Avanti polar lipids).

Les phosphoinositides contrebalanceraient l'effet d'ordre du cholestérol en induisant du désordre au sein de la membrane.

Ces études de caractérisation et de dynamique ont été menées sur les NERs issus du système naturel et ont apporté de nouvelles bases pour la compréhension de la formation de l'enveloppe nucléaire. Cependant, comme tout système naturel, la complexité moléculaire y est très importante et il est donc difficile de définir l'effet d'une molécule en particulier. Le but de cette étude est de vérifier si la composition lipidique originale des NERs peut être corrélée aux capacités de ces membranes à conduire la formation de l'enveloppe nucléaire. Pour cela, nous avons travaillé sur des modèles membranaires mimant la composition lipidique des NERs, afin de s'affranchir de la complexité moléculaire, permettant ainsi de quantifier l'effet de molécules spécifiques (comme le cholestérol et les phosphoinositides) sur les propriétés membranaires. Nos études ont été réalisées par RMN des solides sur les noyaux deutérium et phosphore, ce qui nous a permis de caractériser les propriétés structurales et dynamiques de ces membranes, toujours dans le but de les corrélérer aux mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire.

V.2 Choix et préparation des modèles membranaires

Les modèles membranaires utilisés lors de cette étude sont, comme précédemment, des vésicules multilamellaires. Afin d'utiliser la RMN du deutérium, nous avons utilisé le POPC_{d31}, marqué au deutérium sur la chaîne *sn2*. Nous avons construit six modèles membranaires permettant d'étudier l'effet du cholestérol et des phosphoinositides sur les propriétés membranaires. La proportion des lipides dans les modèles membranaires a été définie par la proportion de ces lipides dans les membranes NERs (Figure V-1). Les différents ratios utilisés sont donnés dans le tableau V-1. Comme précédemment, nous avons utilisé PI-4-P (PIP), le PI-4,5-P₂ (PIP₂) et le PI-3,4,5-P₃ (PIP₃), puisque ce sont ces phosphoinositides que nous retrouvons en quantité majoritaire dans nos membranes naturelles. L'analyse des chaînes aliphatiques des phosphoinositides présents dans NERs montre que nous sommes essentiellement en présence de chaînes longues et polyinsaturées (Garnier-Lhomme et al, 2009). Nous avons donc choisi de travailler essentiellement avec des chaînes 18 :0/20 :4 pour être le plus représentatif possible. Le protocole utilisé pour la formation des MLVs a été exposé au chapitre II.

V.3 Les paramètres d'acquisition des expériences de RMN

Différentes températures ont été étudiées: -5, 0, 10 et 20 °C +/- 1 °C. Les échantillons sont stabilisés pendant 30 minutes avant l'acquisition.

V.3.1 Les paramètres pour la RMN du deutérium

Les expériences RMN de deutérium ont été enregistrées à 76 MHz ou 107 MHz au moyen d'une séquence d'écho quadrupolaire (cf chapitre II; Davis, 1976). Les paramètres d'acquisition sont les suivants : fenêtre spectrale de 500 kHz, impulsion 90 ° de 2,75 à 3,50 µs suivant la puissance utilisée, délai entre les impulsions (délai d'écho) de 30 à 40 µs. Le temps de recyclage est de 1,5 secondes. Les spectres du deutérium sont obtenus au moyen 4k à 100k scans en fonction de la quantité de lipides deutérés présente dans l'échantillon. Un LB de 200 à 300 Hz a été appliqué avant la transformée de Fourier.

V.3.2 Les paramètres pour la RMN du phosphore

Les expériences RMN ont été réalisées à 162 MHz and 283 MHz avec une séquence d'impulsion d'écho de Hahn (cf chapitre II; Rance, 1983). Les paramètres d'acquisition sont les suivants: fenêtre spectrale de 75-150 kHz, impulsion à 90 ° de 5,5 à 12,20 µs suivant la puissance utilisée, délai entre les impulsions de 30 à 50 µs et un temps de recyclage de 5 s. 5k scans ont été enregistrés pour les spectres de RMN du phosphore. Un LB de 50 à 100 Hz a été appliqué avant la transformée de Fourier. Les déplacements chimiques du phosphore ont été référencés par rapport à l'acide phosphorique à 85% (0 ppm).

V.4 Etude de l'effet du cholestérol et des phosphoinositides sur les propriétés membranaires des NERs

Nous avons préparé différents modèles membranaires basés sur la composition lipidique des NERs afin d'étudier leurs caractéristiques membranaires par RMN des solides. Nous avons dans un premier temps eu recours à la RMN du deutérium qui apporte des informations concernant la dynamique des chaînes lipidiques au sein de la membrane. Nous avons ensuite étudié nos systèmes par RMN du phosphore qui apporte cette fois-ci des informations sur la dynamique des têtes polaires des lipides. Ces deux méthodes sont donc complémentaires et permettent une caractérisation complète de la membrane.

V.4.1 Etude par RMN du deutérium

a) Les spectres en RMN du deutérium

La figure V-2a présente les spectres RMN du deutérium des modèles POPC (contrôle), POPC/Chol et POPC/Chol/PI dont les ratios molaires sont 58/42 et 28/42/30 pour les deux derniers systèmes. La gamme de températures étudiées s'étend de -5 °C à 20 °C.

Comme mentionné précédemment, les spectres de POPC sont caractéristiques d'une phase lamellaire de type MLVs avec transition de phase aux alentours de -5 °C. Lorsque nous rajoutons du cholestérol, nous n'observons plus de transition de phase. En effet, à partir de -5 °C, nous obtenons un spectre à symétrie axiale large et ceci sur toute la gamme de températures. On obtient donc une réduction de l'ordre à basse température et une augmentation de l'ordre à haute température (au-dessus de la température de transition de phase de POPC dans notre cas). Ceci est la signature bien connue de la phase liquide ordonnée (lo) engendrée par la présence de stérol (Vist et Davis, 1990 ; Pott et al., 1995 ; Faure et al., 1996 ; McMullen et al., 2004 ; Beck et al., 2007 ; Dufourc, 2008). Dans cette phase, les lipides gardent une diffusion latérale comparable à une phase purement fluide, mais les chaînes aliphatiques sont fortement ordonnées. On parle alors communément de la phase lo, comme une phase qui partage les propriétés d'une phase fluide et d'une phase gel (Aussenac et al., 2003 ; Beck et al., 2007 ; Dufourc, 2008).

Lorsque nous rajoutons du PI, nous observons toujours une phase lo (spectres larges sur toute la gamme de températures étudiées). Cependant, nous constatons que les spectres du modèle contenant PI sont moins larges que ceux obtenus pour le modèle POPC/Chol, traduisant une augmentation de la dynamique. Cet effet est davantage marqué à 10 °C et 20 °C. Nous constatons qu'à 10 et 20 °C, la largeur des raies individuelles s'est élargie. Ceci pourrait s'expliquer par une situation d'échange intermédiaire du POPC (à l'échelle des temps de la RMN) entre deux environnements de dynamique différente. Nous pouvons alors supposer la présence de deux phases : une phase de type liquide ordonnée et une phase de type fluide. Pour les deux systèmes POPC/Chol et POPC/Chol/PI, nous notons la présence d'un pic isotrope (représentant 2-3 % de l'aire totale du spectre).

La figure IV-2b montre l'évolution des moments d'ordre 1 de ces trois systèmes en fonction de la température. Comme déjà vu pour le modèle POPC, nous observons clairement la zone de transition de phase se traduisant par des valeurs de M_1 importantes à -5 °C. Lorsque nous rajoutons du cholestérol, la variation des M_1 change drastiquement.

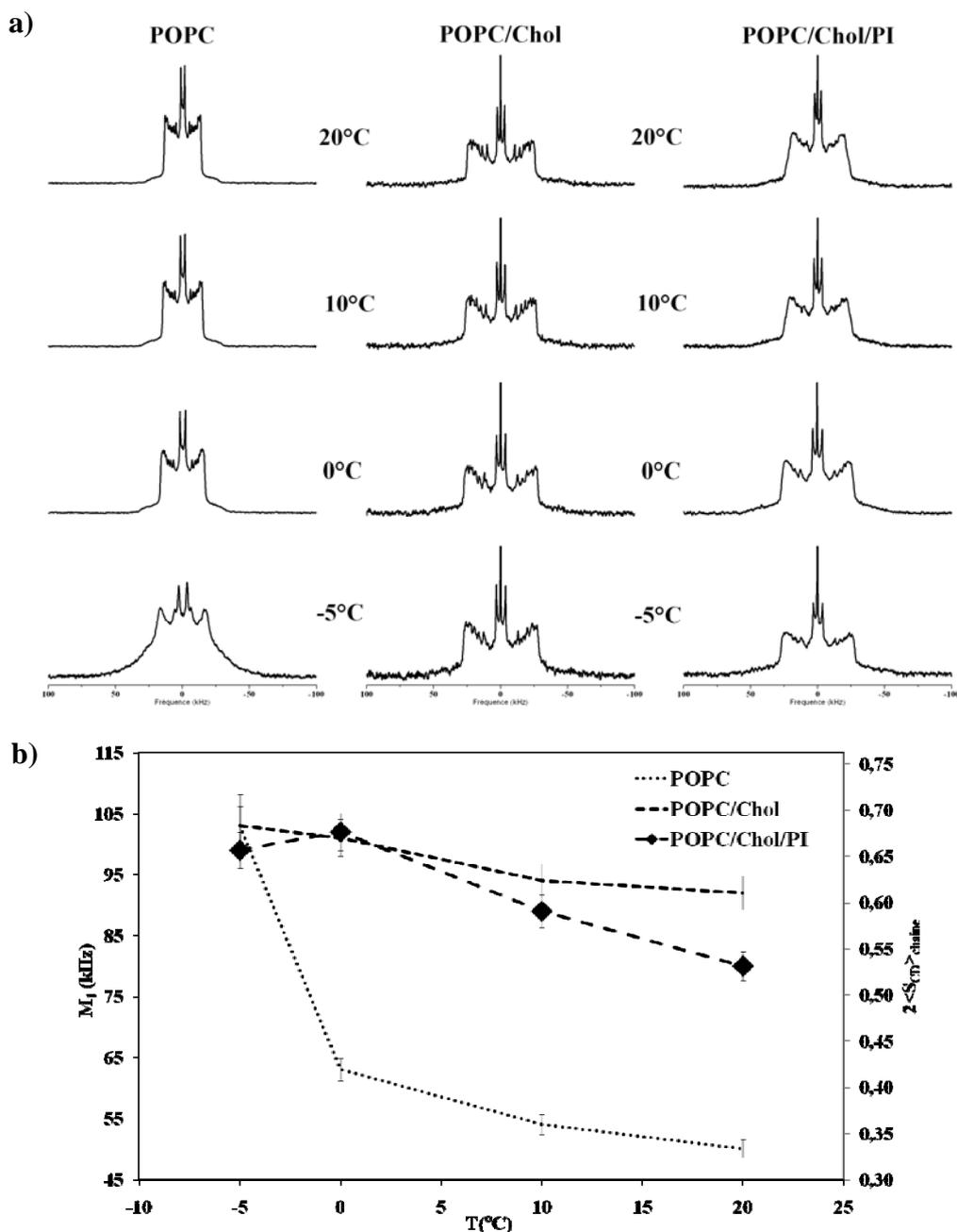


Figure V-2 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/Chol et POPC_{d31}/Chol/PI. L'échantillon est hydraté à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeuté. Les températures sont indiquées au centre de l'image. Les mélanges POPC/Chol et POPC/Chol/PI sont composés d'un ratio molaire de 58/42 et 28/42/30 respectivement. **b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température.** L'erreur est estimée à 3-5%. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen de la chaîne lipidique (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01-0,03$.

En effet, nous obtenons des valeurs de M_1 élevées sur toute la gamme de températures et par conséquent une abolition de la rupture de pente, caractéristique de la zone de transition de phase. Ceci est caractéristique de la phase l_o engendrée par la présence de cholestérol (Dufourc et al., 1984 ; Vist et Davis, 1990 ; Marsan et al., 1999 ; Beck et al., 2007 ; Dufourc, 2008). A 10°C, M_1 vaut 94 ± 3 kHz pour POPC/Chol (soit un $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ de $0,62 \pm 0,02$) alors que nous obtenons 54 ± 2 kHz pour POPC (soit un $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ de $0,36 \pm 0,01$). L'addition de PI sur le système POPC/Chol n'induit pas de changements considérables comparés au système POPC/Chol. Nous obtenons des valeurs relativement élevées sur toute la gamme de températures, sans transition de phase. De -5°C à 10°C, les différences entre les moments ne sont pas significatives. Par exemple, nous obtenons des M_1 de 89 ± 3 kHz (soit un $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ de $0,59 \pm 0,02$) à 10 °C pour le modèle POPC/Chol/PI contre 94 ± 3 kHz (soit un $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ de $0,62 \pm 0,02$) pour POPC/Chol. A 20 °C, le système contenant du PI présente une dynamique légèrement supérieure à celle constatée dans le système POPC/Chol. L'effet du cholestérol est donc conservé avec cependant un effet fluidifiant de PI sur la phase l_o à partir de 20°C.

Nous avons ensuite étudié l'effet de PIP et PIP₂ respectivement sur le système POPC/Chol/PI (Figure V-3a). La composition lipidique des POPC/Chol/PI/PIP_n (avec $n = 1$ ou 2) est de 28/42/23/7 (ratio molaire). L'addition de PIP ou de PIP₂ au système PC/Chol/PI ne change pas l'allure générale des spectres. Ceci signifie que nous restons en phase liquide ordonnée. Nous constatons néanmoins que les spectres semblent plus larges pour le système contenant PIP₂.

L'analyse des moments d'ordre 1 nous permet d'être plus précis (Figure V-3b). Pour le système POPC/Chol/PI/PIP, nous observons que les valeurs des M_1 sont plus faibles que celles obtenues pour le système POPC/Chol : en effet, à 10 °C nous avons $M_1 = 80 \pm 2$ kHz ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,54 \pm 0,02$) et 94 ± 3 kHz ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,62 \pm 0,02$), respectivement pour ces deux systèmes. PIP induit donc du désordre dans une membrane de POPC/Chol. Cependant, les valeurs des paramètres d'ordre restent encore élevées comparées à celles obtenues pour le système POPC. Nous sommes donc toujours en phase liquide ordonnée. Nous avons ensuite étudié le système POPC/Chol/PI/PIP₂. Les valeurs du paramètre d'ordre global pour le système POPC/Chol/PI/PIP₂ sont semblables à celles obtenues pour POPC/Chol de -5 °C à 10 °C : par exemple à 10 °C, nous avons $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,63 \pm 0,02$ et $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,62 \pm 0,02$, respectivement. PIP₂ n'augmente pas la fluidité de cette membrane pour ces températures. A 20 °C, le système POPC/Chol/PI/PIP₂ devient plus fluide que le système POPC/Chol et présente un environnement dynamique similaire au système POPC/Chol/PI.

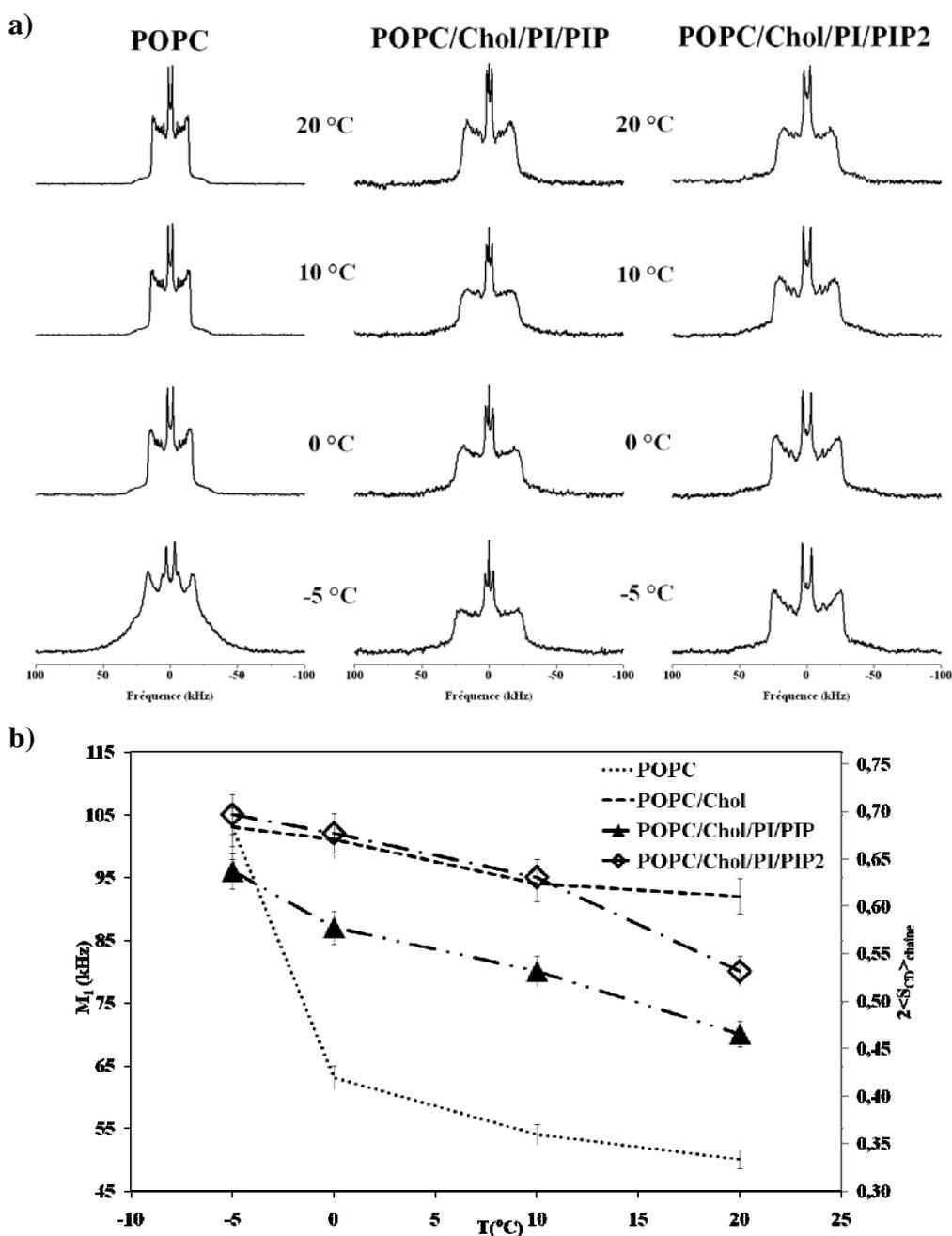


Figure V-3 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/Chol/PI/PIP et POPC_{d31}/Chol/PI/PIP₂. L'échantillon est hydraté à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeuté. Les températures sont indiquées au centre de l'image. Les mélanges POPC/Chol/PI/PIP et POPC/Chol/PI/PIP₂ sont composés d'un ratio molaire de 28/42/23/7 et 28/42/23/7 respectivement. b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) et paramètres d'ordre 2 $\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température. L'erreur sur les moments est estimée à 3-5%. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen de la chaîne lipidique (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01-0,03$.

En effet, nous obtenons des paramètres d'ordre globaux de $0,53 \pm 0,02$ pour les systèmes POPC/Chol/PI/PIP₂ et POPC/Chol/PI contre $0,61 \pm 0,02$ pour le système POPC/Chol.

Nous avons donc constaté que PIP contrebalance, dans une certaine mesure, l'effet d'ordre du cholestérol en augmentant la fluidité. Nous faisons le même constat pour PIP₂, mais son effet est moins prononcé (visible uniquement à partir de 20 °C).

La figure V-4a présente les spectres deutérium des systèmes : POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ 28/42/16/7/7 et POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 28/42/11/7/7/5. Ce dernier constitue le système dont la composition lipidique se rapproche le plus de celle contenu dans les membranes NERs. Par souci de simplification, nous appellerons ce modèle, le modèle « NERs ». Les spectres du système POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ sont caractéristiques d'une phase liquide ordonnée. Nous observons le même phénomène pour le système « NERs », avec néanmoins un rétrécissement significatif de la largeur des spectres.

Les moments M_1 sont similaires pour les systèmes POPC/Chol et POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ de -5 °C à 10°C (Figure V-4b). En effet, à 10 °C, nous avons des M_1 de 93 ± 3 kHz (soit $2 \langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = 0,62 \pm 0,02$) pour ces deux systèmes. La dynamique au sein de ces membranes est similaire dans cette gamme de températures. A 20°C, le M_1 du modèle POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ devient légèrement plus faible que celui du système POPC/Chol, traduisant une augmentation de la dynamique membranaire à partir de 20°C.

A -5 °C, le système « NERs » présente des paramètres d'ordre similaires à ceux du système POPC/Chol, traduisant un ordre équivalent dans ces deux membranes. De 0 °C à 20 °C, nous observons une augmentation de la dynamique globale du système (par rapport au système POPC/Chol), puisque les valeurs des paramètres d'ordre ont diminué. En effet, à 10 °C, $2 \langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ vaut $0,50 \pm 0,02$ pour le modèle « NERs » contre $0,62 \pm 0,02$ pour le système POPC/Chol. La présence de PI, PIP, PIP₂ et PIP₃ fluidifie une membrane de POPC/Chol, tout en conservant la phase liquide ordonnée.

b) Etude de l'ordre local à l'interface et au centre de la bicouche

Nous allons maintenant considérer les paramètres d'ordres locaux S_{CD} qui vont nous permettre de caractériser de manière plus précise ce qui se passe au niveau des chaînes hydrophobes des lipides. Chacun de nos résultats obtenus pour les systèmes complexes sera comparé à POPC (contrôle négatif de phase liquide ordonnée), POPC/Chol (contrôle positif de phase liquide ordonnée), mais aussi à POPC/Chol/PI (à titre de contrôle de phase liquide ordonnée fluidifiée). Nous avons également souhaité étudier le profil d'ordre de nos différents systèmes.

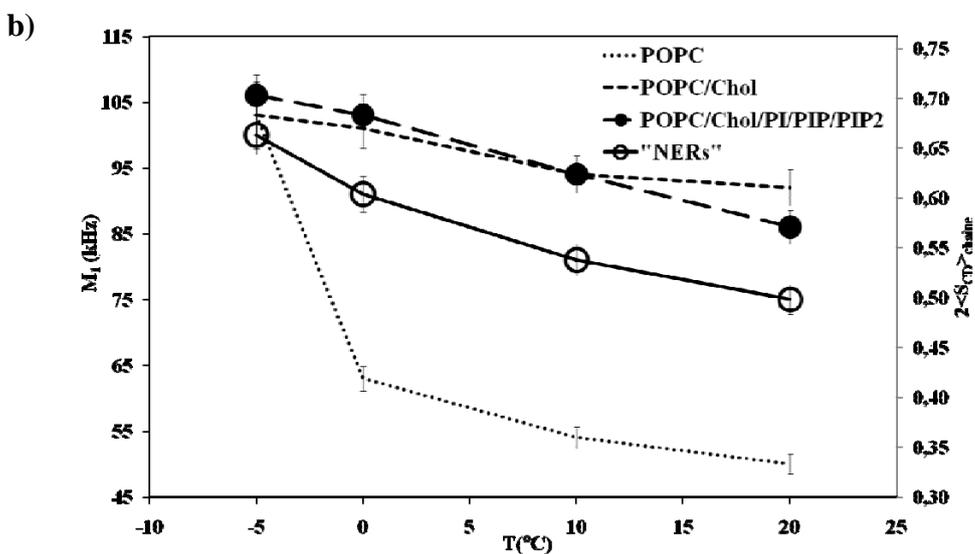
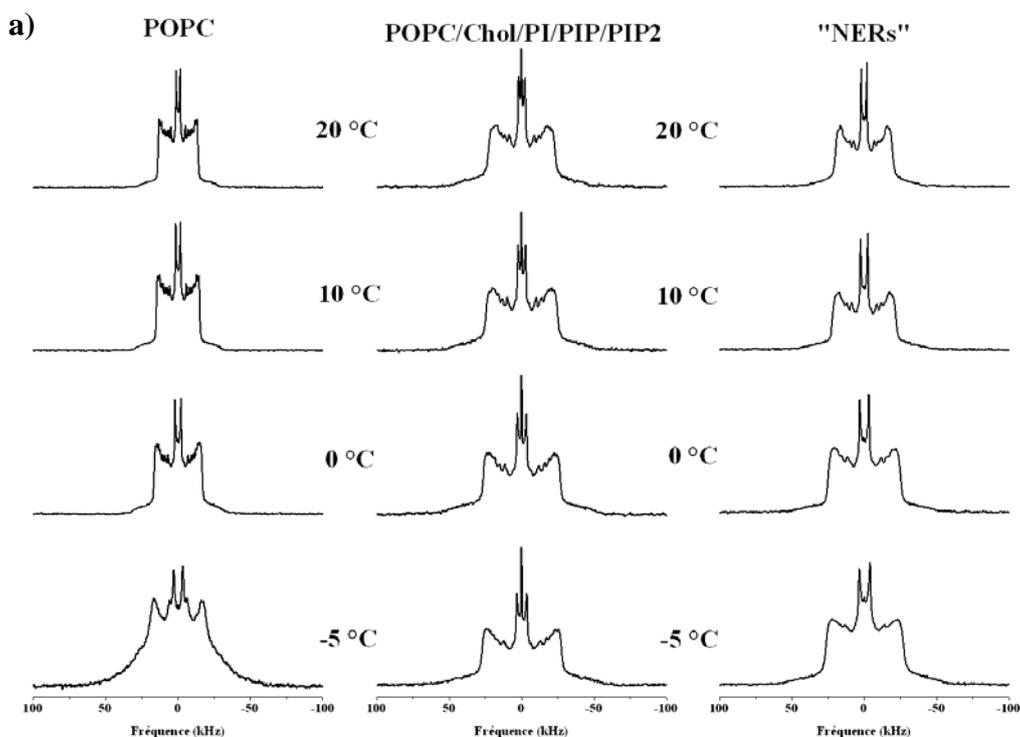


Figure V-4 a) Spectres de RMN du deutérium des systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/Chol/PI/PIP/PIP₂ et « NERs ». L'échantillon est hydraté à 95% dans le tampon MOPS pH 7,2 dédeutééré. Les températures sont indiquées au centre de l'image. Les mélanges POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ et « NERs » (POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃) sont composés d'un ratio molaire de 28/42/16/7/7 et 28/42/11/7/7/5 respectivement. b) Moments spectraux d'ordre 1 (M_1) calculés à l'aide des spectres précédents en fonction de la température. L'erreur est estimée à 3-5%. Sur le deuxième axe vertical est représenté le paramètre d'ordre moyen $2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$ de la chaîne lipidique (voir chapitre II pour plus de détails). L'erreur est estimée à $\pm 0,01-0,03$.

Cependant, à part pour le système POPC/Chol, la résolution et le rapport signal sur bruit des spectres déconvolués n'étaient pas suffisants pour permettre l'attribution des pics intermédiaires.

La figure V-5a montre l'évolution des éclatements quadrupolaires, $\Delta\nu_Q$ (paramètres d'ordre, $2S_{CD}$, sur l'axe de droite), des systèmes POPC, POPC/Chol, POPC/Chol/PI et POPC/Chol/PI/PIP, au niveau de la région « plateau » (graphe de gauche) et de la région des méthyles terminaux (graphe de droite), en fonction de la température. POPC donne des paramètres d'ordre allant de $0,58\pm 0,02$ lorsque nous sommes dans la zone de transition de phase (ordre correspondant à la phase fluide) à $0,43\pm 0,02$ en présence d'une phase fluide. Lorsque nous rajoutons du cholestérol (42% molaire), nous observons une hausse significative des paramètres d'ordres, de $0,86\pm 0,02$ à $0,78\pm 0,02$, caractéristique d'une phase liquide ordonnée (Aussenac et al., 2003). La même tendance est observée au niveau des méthyles en bout de chaîne. L'effet cholestérol est donc ressenti en profondeur dans la membrane.

Nous avons ensuite étudié l'effet de PI sur POPC/Chol. Bien que les valeurs des paramètres d'ordres restent élevées par rapport à POPC seul, nous constatons une baisse de celles-ci comparées à POPC/Chol. En effet, $2S_{CD}$ va de $0,82\pm 0,02$ à $0,63\pm 0,02$ sur la gamme de températures étudiées. Nous avons donc un effet fluidifiant de PI sur la phase lo. Au niveau des méthyles, l'effet fluidifiant de PI sur POPC/Chol ne semble être perçu qu'à partir de 20°C .

Le système POPC/Chol/PI/PIP présente une dynamique similaire au système POPC/Chol/PI, avec un paramètre d'ordre de $0,69\pm 0,02$ pour le système contenant PIP à 10°C . La présence de PI et de PIP présentent un effet fluidifiant sur la phase lo. Au niveau des méthyles, les paramètres d'ordre sont plus faibles que ceux obtenus pour POPC/Chol/PI. L'effet fluidifiant de PI et PIP serait plus fort au cœur de la membrane qu'à proximité de l'interface (région « plateau »).

PIP₂ présente un comportement différent de celui observé pour PIP. En effet, PIP₂ n'a pas d'effet sur la dynamique du système POPC/Chol/PI à basse température, mais induit une légère augmentation de l'ordre à partir de 10°C (Figure V-5b). A titre d'exemple, à 10°C nous obtenons un paramètre d'ordre $2S_{CD\text{plateau}}$ de $0,73\pm 0,02$ pour le système POPC/Chol/PI/PIP₂ contre $0,69\pm 0,02$ pour POPC/Chol/PI/PIP. PIP₂ présente donc un effet d'ordre sur le système POPC/Chol/PI. Nous avons observé le même phénomène en l'absence de cholestérol où PIP₂ augmentait l'ordre du système POPC/PI. L'effet d'ordre de PIP₂ n'est pas ressenti au niveau des méthyles.

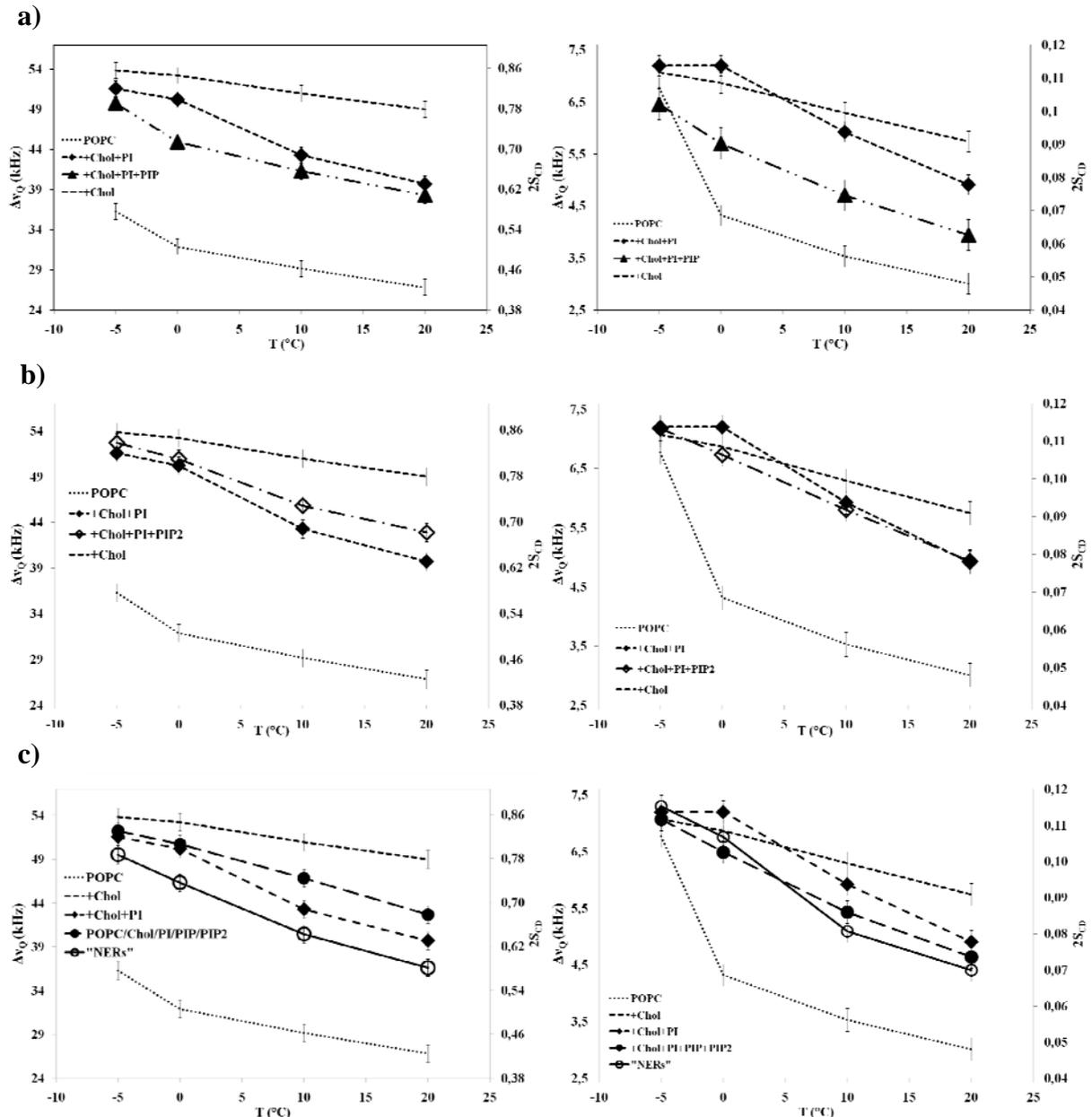


Figure V-5 Eclatements quadrupolaires et paramètres d'ordre de membranes contenant des PPIs en fonction de la température. A gauche, nous avons les éclatements quadrupolaires correspondant à la région « plateau ». A droite, les éclatements quadrupolaires de la région des méthyles terminaux sont représentés. a) systèmes POPC_{d31}, POPC_{d31}/Chol 58/42, POPC_{d31}/Chol/PI 28/42/30 et POPC_{d31}/Chol/PI/PIP 28/42/23/7. b) système POPC_{d31}/Chol/PI/PIP₂ 28/42/23/7. c) systèmes POPC_{d31}/Chol/PI/PIP/PIP₂ 28/42/16/7/7 et systèmes « NERs » : POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 28/42/11/7/7/5. L'erreur est estimée à ± 1 kHz ($\pm 0,02$) et à $\pm 0,2$ kHz ($\pm 0,003$) pour la mesure de l'éclatement quadrupolaire (du paramètre d'ordre) au niveau de la région « plateau » et des méthyles terminaux, respectivement.

La figure V-5c montre les paramètres d'ordre obtenus pour les modèles POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ 28/42/16/7/7 et POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 28/42/11/7/7/5 (modèle « NERs »).

Le modèle contenant PIP et PIP₂ montre une augmentation de l'ordre comparé au système POPC/Chol/PI à partir de 10 °C. En dessous, il n'y a pas de différences de dynamique entre ces deux systèmes. A 10 °C, nous obtenons $2S_{CD\text{plateau}} = 0,75 \pm 0,02$ pour POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ contre $0,69 \pm 0,02$ pour POPC/Chol/PI. L'effet d'augmentation de l'ordre de PIP₂ prédominerait donc dans ce système. Au niveau des méthyles, l'effet ressenti est plus complexe. En effet, les paramètres d'ordre déterminés sont plus faibles entre 0 °C et 10 °C que ceux obtenus pour le système POPC/Chol/PI. A ces températures, on a un effet fluidifiant au niveau des méthyles. A -5 °C et 0 °C, nous n'avons pas d'effet comparé au système POPC/Chol/PI.

Le système « NERs » montre une augmentation de la dynamique comparé à POPC/Chol/PI (et donc aussi par rapport au modèle POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂) à partir de 0°C. Par exemple, à 10 °C, nous avons un paramètre d'ordre $2S_{CD\text{plateau}}$ de $0,65 \pm 0,02$ pour le système « NERs », un S_{CD} de $0,69 \pm 0,02$ pour POPC/Chol/PI et de $0,75 \pm 0,02$ pour le modèle POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂. Nous avons donc un effet de désordre de PIP₃ sur le modèle POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂. L'effet combiné de PI, PIP, PIP₂ et PIP₃ sur la phase liquide ordonnée POPC/Chol montre un effet fluidifiant. Au niveau des méthyles, l'effet fluidifiant des PPIs est ressenti en profondeur de la membrane à partir de 10 °C. Le système « NERs » se trouve donc dans une phase liquide ordonnée, néanmoins plus fluide de part la présence des phosphoinositides.

V.4.2 Etude par RMN du phosphore-31

Afin de compléter la caractérisation des modèles membranaires, nous avons enregistré les spectres de RMN du phosphore de nos systèmes précédents.

a) Les spectres de RMN du phosphore-31

La figure V-7 montre les spectres de RMN du phosphore des modèles : POPC, POPC/Chol, POPC/Chol/PI, POPC/Chol/PI/PIP₂, POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ et enfin le modèle « NERs » constitué de POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ (28/42/11/7/7/5).

Pour le modèle POPC, nous obtenons un spectre de poudre à symétrie axiale caractéristique des MLVs (distribution sphérique). Nous observons également une transition de phase aux environs de -5 °C.

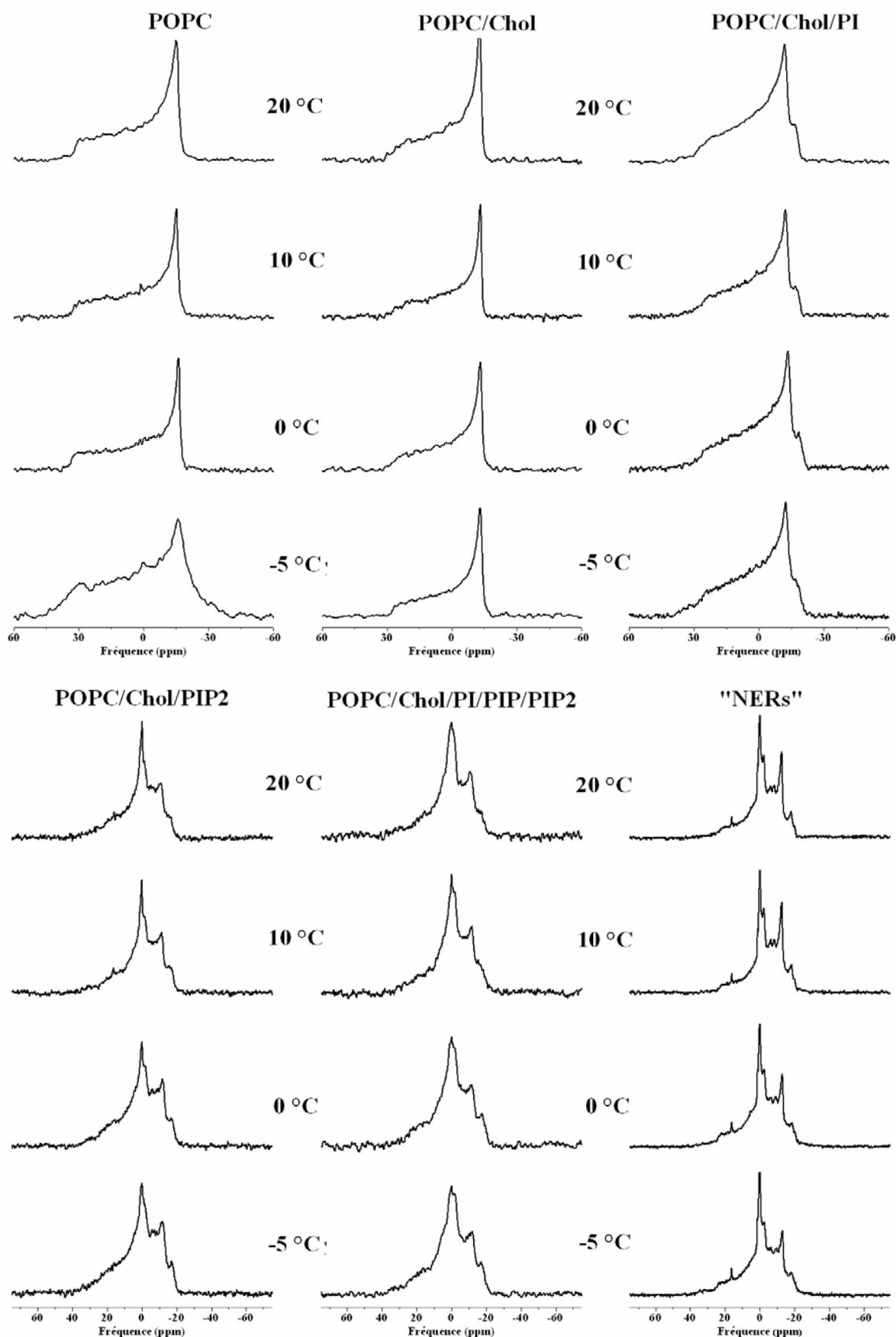


Figure V-6 Spectres de RMN du phosphore des systèmes POPC, POPC/Chol, POPC/Chol/PI, POPC/Chol/PI/PIP₂, POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ et « NERs ». Les échantillons sont hydratés à 95% dans le tampon MOPS pH 7,0. Les températures sont indiquées sur la figure. Les spectres sont référencés par rapport à H₃PO₄ 85% (0 ppm).

Les spectres de POPC/Chol montrent que nous restons en phase lamellaire. De plus, nous n'observons plus de transition de phase au cours de la gamme de températures. En effet, les spectres de RMN du phosphore conservent une forme et une largeur similaire sur toute la gamme de températures. Cette tendance est caractéristique d'une phase liquide ordonnée (Aussenac et al., 2003). Nous constatons également une diminution de la largeur des spectres comparée à POPC. Ce phénomène est dû à la présence du cholestérol qui s'intercale entre les phospholipides, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'espace entre les têtes polaires (Vist et Davis, 1990 ; Pott et al., 1995). Les phosphores possèdent alors une liberté de mouvement de réorientations plus importante, ce qui entraîne une diminution de l'anisotropie de déplacement chimique (Vist et Davis, 1990 ; Pott et al., 1995 ; Aussenac et al., 2003).

L'addition de PI ne modifie pas l'allure générale des spectres. Nous restons en phase lamellaire et nous n'observons pas de transition de phase gel-fluide. Cependant, nous remarquons que nos spectres sont composés de deux spectres de poudres dotés de deux anisotropies de déplacement chimique différentes. Chaque phosphore a donc un $\Delta\sigma$ différent. Cela a déjà été rapporté lors du chapitre précédent pour la composition POPC/PI.

Nous avons ensuite étudié le système POPC/Chol/PI/PIP₂. Nous constatons que nous restons en phase lamellaire dans la gamme de températures étudiées. Cependant les spectres sont plus complexes en raison de la superposition de cinq $\Delta\sigma$ différents, conduisant à une enveloppe spectrale plus complexe. Nous remarquons également une raie intense, qui pourrait provenir d'une contribution isotrope ou bien de la faible anisotropie de déplacement chimique du phosphomonoester 5 de PIP₂. Ceci sera étudié plus en détails ultérieurement.

Pour le système POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂, nous sommes toujours en présence d'une phase lamellaire sans transition de phase sur la gamme de températures étudiées. Dans ce système, nous sommes en présence de sept phosphates avec différents $\Delta\sigma$ (PIP rajoute deux phosphores de plus par rapport au système précédent). Les spectres sont donc le résultat de la superposition de sept spectres de poudre caractéristiques de chaque phosphore.

Le système « NERs » montre également une phase lamellaire sans transition de phase sur la gamme de températures étudiées. Le spectre global obtenu correspond, cette fois-ci, à la superposition de onze spectres de poudre : un pour PC, un pour PI, deux pour PIP, trois pour PIP₂ et enfin quatre pour PIP₃. Nous observons également une contribution isotrope sur les spectres.

b) Attribution des anisotropies de déplacement chimique

Comme nous l'avons fait dans les chapitres précédents, nous avons déterminé les anisotropies de déplacement chimique pour les différents modèles (spectres et simulation). Le tableau V-2 répertorie les différents $\Delta\sigma$.

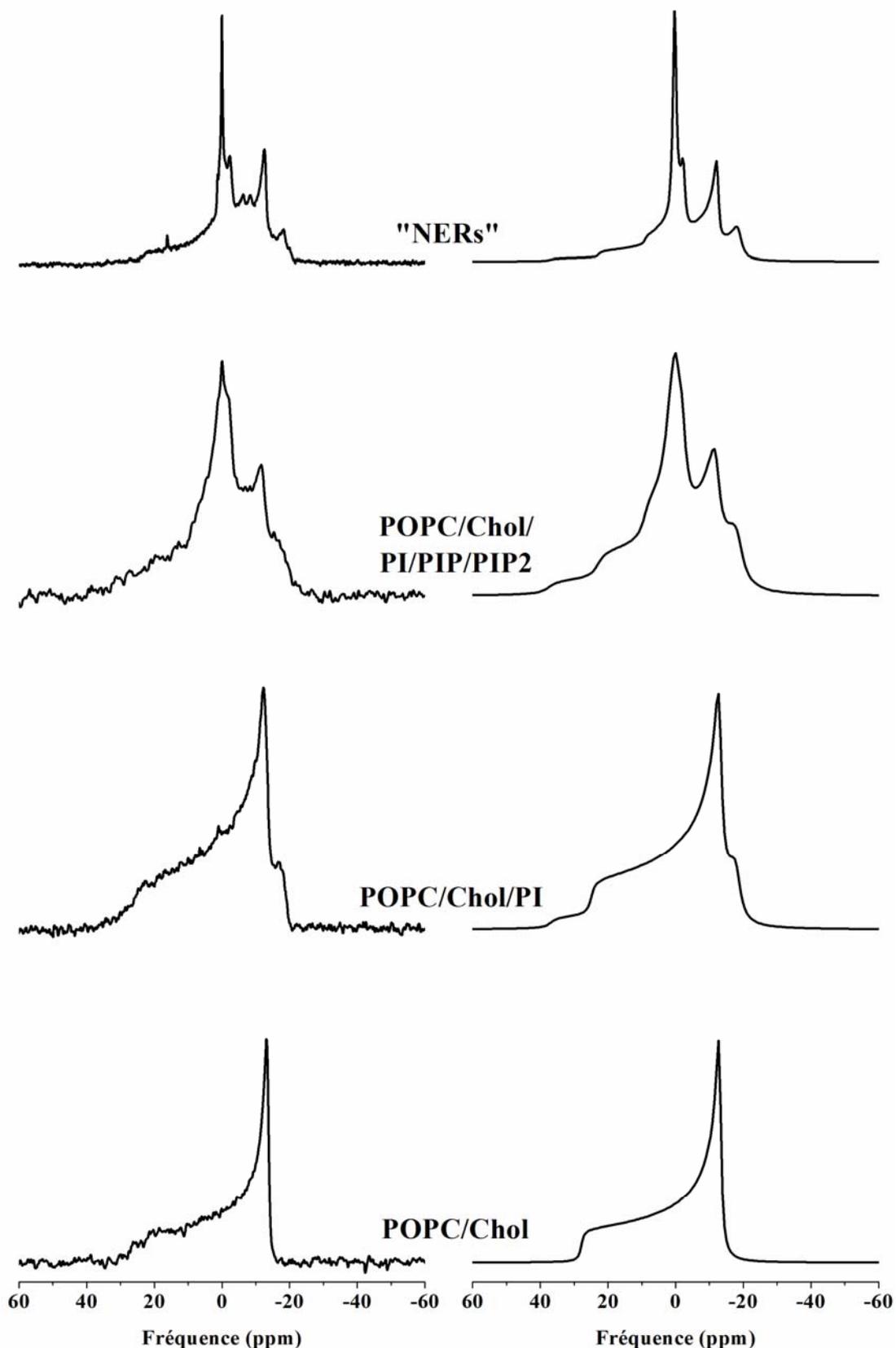


Figure V-7 Comparaison entre le spectre expérimental (gauche) et le spectre simulé (droite) des systèmes POPC/Chol 58/42, POPC/Chol/PI 28/42/30, POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ 28/42/16/7/7, et POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 28/42/11/7/7/5 (« système NERs »). La température est de 10°C. Les paramètres de simulation sont présentés dans les tableaux IV-4.

A 10 °C (température proche de la température physiologique des oursins), POPC présente un $\Delta\sigma$ de -47 ppm. En présence de cholestérol, $\Delta\sigma$ diminue à $-40,8\pm 1,5$ ppm. Une diminution de $\Delta\sigma$ traduit une augmentation de la dynamique du phosphore et/ou un changement d'orientation de ce phosphore. Ceci s'explique par la présence de cholestérol qui induit un espace supplémentaire entre les têtes polaires (Vist et Davis, 1990 ; Pott et al., 1995). La figure V-7 montre une comparaison des spectres expérimentaux et simulés pour ce système.

Pour le système POPC/Chol/PI, nous avons pu déterminer les anisotropies de déplacement chimique pour chaque phosphore étant donné que les deux spectres de poudre sont bien résolus. Nous avons attribué un $\Delta\sigma$ de $-37,8\pm 1,5$ ppm pour POPC et de $-54,9\pm 1,5$ ppm pour PI. Le $\Delta\sigma$ de PC a de nouveau diminué du fait de la présence de PI, ce qui signifie que PI induit une augmentation de la dynamique et/ou un changement d'orientation supplémentaire. Nous avons attribué lors de nos précédentes études un $\Delta\sigma$ de $-61,5\pm 2,5$ ppm pour PI en présence de POPC (pour un ratio molaire de 60/40). Nous constatons donc une diminution de $\Delta\sigma$ pour PI en présence de cholestérol. L'effet du cholestérol (effet d'espace entre les têtes polaires augmentant la liberté de mouvement) agit également au niveau des PI. Le calcul d'un spectre de RMN du phosphore à partir des données déterminées sur les spectres a validé nos attributions (Figure V-7). Les paramètres de simulation optimisés sont présentés dans le tableau V-3.

Nous avons pu également extraire les différents $\Delta\sigma$ des lipides contenus dans le modèle POPC/Chol/PI/PIP₂. Pour cela, nous nous sommes basés sur nos résultats précédents notamment pour l'attribution des phosphores P4 et P5 des phosphoinositides. Nous obtenons des anisotropies de déplacement chimique de $-35,2\pm 1,5$ ppm pour PC et de $-52,6\pm 3,0$ ppm pour les phosphodiester de PI et PIP₂, ces deux derniers phosphore n'ayant pu être distingués l'un de l'autre. Nous observons donc une diminution des $\Delta\sigma$ pour PC, PI, et PIP₂ (qui avait un $\Delta\sigma$ de -59,1 ppm en présence de POPC pour un mélange 30/12 : chapitre IV). Ceci peut être dû à un effet combiné du cholestérol et des phosphoinositides présents pour le PC, et enfin au cholestérol pour PI et PIP₂. Nous avons ensuite extrait un $\Delta\sigma$ de $-11,0\pm 1,5$ ppm que nous avons attribué au phosphore en position 4 sur le cycle inositol de PIP₂. Le dernier $\Delta\sigma$ mesuré est de $-2,0\pm 0,5$ ppm et est attribué au phosphore de PIP₂ en position 5 du cycle inositol. Ces attributions suivent le même raisonnement présenté dans les chapitres III et IV précédents, dans lequel il avait été montré que P4 présentait un $\Delta\sigma$ plus large que P5. Les $\Delta\sigma$ de ces deux phosphores diminuent si on les compare à ceux obtenus en l'absence de cholestérol.

$\Delta\sigma$	Composition des modèles membranaires					
	POPC	POPC/Chol	POPC/Chol/PI	POPC/Chol/PI/PIP ₂	POPC/Chol/PI/PIP/PIP ₂	«NERs»
PC	-47±1,5	-40,8±1,5	-38,0±1,5	-35,0±1,5	-35,0±1,5	-35,5±1,5
PI	-	-	-60±1,5	-52,6±3,0	-56,0±3,5	-56,0±5,0
PIP	-	-	-	-	-56,0±3,5	-56,0±5,0
PIP ₂	-	-	-	-52,6±3,0	-56,0±3,5	-56,0±5,0
PIP ₃	-	-	-	-	-	-56,0±5,0
PIP	-	-	-	-	-11,5±2,5	-11,5±1,5
PIP ₂ 4	-	-	-	-11,0±2,5	-11,5±2,5	-11,5±1,5
PIP ₂ 5	-	-	-	-2,0±0,5	-1,5±1,0	-1,0±0,5
PIP ₃ 3	-	-	-	-	-	-0,0±1,0*
PIP ₃ 4	-	-	-	-	-	-1,0±0,5
PIP ₃ 5	-	-	-	-	-	-1,0±0,5

Tableau V-2 Anisotropies de déplacement chimique du phosphore pour les systèmes POPC, POPC/Chol, POPC/Chol/PI, POPC/Chol/PI/PIP₂, POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ et «NERs». Les valeurs sont exprimées en ppm. L'erreur est estimée directement sur les spectres. Cette attribution est donnée pour une température de 10 °C. * : paramètre estimé à l'aide de la simulation du spectre de RMN du phosphore correspondant.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
POPC	-38	300	-1	0,28	1,00
PI	-60	500	-0,40	0,30	1,00

Tableau V-3 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système POPC/Chol/PI 28/42/30. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C. T_2 est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome.

L'effet « espaceur » du cholestérol est donc également ressenti au niveau du cycle inositol des phosphoinositides.

Une étude similaire a été effectuée sur le système POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂. Un $\Delta\sigma$ de $-35,0 \pm 1,5$ ppm a été obtenu pour POPC. La présence de cholestérol, PI, PIP et PIP₂ induit une diminution du $\Delta\sigma$ de POPC. Pour les phosphodiester, nous obtenons, comme précédemment, un seul pic qui ne nous permet pas de différencier les trois phosphores. Ce $\Delta\sigma$ est de $-56,0 \pm 3,5$ ppm. Nous avons ensuite extrait un $\Delta\sigma$ de $-11,5 \pm 2,5$ ppm que nous avons attribué aux phosphores monoester de PIP et de PIP₂ en position 4 du cycle inositol. Le dernier $\Delta\sigma$ mesuré est de $-1,5 \pm 1,0$ ppm et est attribué au phosphore de PIP₂ en position 5 du cycle inositol. Les $\Delta\sigma$ des phosphates des PPIs diminuent en présence de cholestérol (sans cholestérol, nous avons obtenus des $\Delta\sigma$ de l'ordre de -60 , -14 et -3 ppm). La simulation d'un spectre de RMN du phosphore à partir de ces attributions donne une bonne concordance des spectres (Figure V-7). Les paramètres de simulation utilisés sont présentés dans le tableau V-4.

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
POPC	-35	500	-1	0,28	1, 00
PI	-56	700	-0,40	0,15	1,00
PIP	-56	700	-0,40	0,07	1,00
PIP₂	-56	700	-0,40	0,07	1, 00
PIP	-11,5	400	+1	0,07	1,00
PIP₂(P4)	-11,5	400	+1	0,07	1,00
PIP₂(P5)	-1,5	400	+0,2	0,07	1,00

Tableau V-4 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ 30/42/16/7/7. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C. T_2 est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome.

Nous avons ensuite étudié le modèle « NERs ». Malgré un spectre complexe, nous avons pu extraire un certain nombre d'anisotropies de déplacement chimique à l'aide de la simulation. Dans ce système, POPC présente un $\Delta\sigma$ de $-35,5 \pm 1,5$ ppm. Nous avons extrait un $\Delta\sigma$ aux alentours de -60 ppm. Ce massif correspondrait aux quatre phosphodiesteres de PI, PIP, PIP₂ et PIP₃. Nous avons ensuite mesuré deux autres $\Delta\sigma$, un à $-11,5 \pm 1,5$ ppm et un à $-1 \pm 0,5$ ppm. Nous supposons que l'anisotropie à $-11,5$ ppm correspondrait aux phosphores 4 de PIP,

PIP₂ et PIP₃ et celle de -1 ppm caractériserait les phosphores 5 de PIP₂ et PIP₃. Nous ne distinguons aucun autre $\Delta\sigma$. Nous ne sommes donc pas en mesure de déterminer l'anisotropie de déplacement chimique associée au phosphore P3 de PIP₃, qui doit se trouver compris dans les deux précédents massifs ne permettant pas alors une détermination précise. A partir de ces résultats, nous avons lancé une simulation d'un spectre de RMN du phosphore. Concernant, les $\Delta\sigma$ de PIP₃, nous sommes partis du fait que le $\Delta\sigma$ du phosphodiester serait similaire à celui observé pour les autres PPIs. La même approximation est faite pour les $\Delta\sigma$ des phosphores P4 et P5, que l'on considère donc équivalents à ceux obtenus pour PIP₂. Concernant le phosphomonoester P3, nous avons commencé la simulation avec un $\Delta\sigma$ équivalent à -3 ppm (comme pour le phosphomonoester P5 dans PIP₂). Nous avons ensuite optimisé les paramètres de simulation afin de se rapprocher le plus possible du spectre expérimental (Figure V-7). Les paramètres de simulation optimisés sont présentés dans le tableau V-5. Nous constatons que nous avons dû abaisser le $\Delta\sigma$ du phosphomonoester P3 à 0 ppm. Ce phosphore P3 présenterait donc une très faible anisotropie de déplacement chimique (l'erreur étant estimée à ± 1 ppm).

	$\Delta\sigma$ (ppm)	$1/\pi T_2$ (Hz)	δ_{iso} (ppm)	Poids moléculaire	c/a
POPC	-35	300	-1	0,33	1, 20
PI	-56	700	-0,40	0,10	1,20
PIP	-56	700	-0,40	0,07	1,20
PIP₂	-56	700	-0,40	0,07	1, 20
PIP₃	-56	700	-0,40	0,05	1, 20
PIP	-11,5	300	+1	0,07	1,20
PIP₂ (P4)	-11,5	300	+1	0,07	1,20
PIP₃ (P4)	-11,5	300	+1	0,05	1,20
PIP₂ (P5)	-1	300	+0,2	0,07	1,20
PIP₃ (P5)	-1	300	+0,2	0,05	1,20
PIP₃ (P3)	0	200	+0,2	0,05	1,20

Tableau V-5 Paramètres de simulation d'un spectre RMN du phosphore du système « NERs » : POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 30/42/16/7/7/5. La simulation a été effectuée à partir des données estimées du spectre expérimental à 10°C. T₂ est le temps de relaxation transversale, δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope du phosphore considéré, c/a est le rapport entre les deux demi-axes du liposome.

Ces résultats permettent de faire un certain nombre de constatations. Les phosphoinositides induisent une diminution supplémentaire du $\Delta\sigma$ de POPC (diminution initiale en présence de cholestérol). L'effet des phosphoinositides, précédemment observé lors

du chapitre IV, est donc conservé en présence du cholestérol. Le cholestérol induit également une diminution des $\Delta\sigma$ des différents PPIs. Nous avons également constaté que les différents $\Delta\sigma$ restent similaires aussi bien dans les systèmes « simples » de type POPC/Chol/PI et POPC/Chol/PI/PIP_n que dans les systèmes plus complexe comme POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂ et le système « NERs ».

V.5 Discussion

Les NERs sont des portions de membranes retenues à chaque pôle du noyau de spermatozoïde et essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire. Ces membranes sont fortement enrichies en cholestérol (42 % molaire des lipides totaux) et en phosphoinositides (30% molaire des lipides totaux soit environ 52% molaire des phospholipides) (Garnier-Lhomme et al., 2009). Il est donc apparu intéressant d'étudier si la composition lipidique particulière des NERs joue un rôle dans les propriétés de ces membranes. Pour cela, nous avons fabriqué des modèles membranaires mimant la composition lipidique des NERs. Sept modèles ont été étudiés. Ces études ont permis de montrer que les systèmes « NERs » présentent une phase liquide ordonnée. Néanmoins, la présence des PPIs au sein ces membranes NERs induit une augmentation de la dynamique dans la phase liquide ordonnée. Ces points vont faire l'objet de la discussion, puis une implication biologique sera présentée.

	$2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ à 10°C	$2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ à 20°C	Effet fluidifiant sur POPC/Chol
POPC	0,36±0,01	0,33±0,01	-
POPC/Chol 58/42	0,62±0,02	0,61±0,02	-
POPC/Chol/PI 28/42/30	0,59±0,02	0,53±0,02	oui pour $T \geq 20$ °C
POPC/Chol/PI/PIP 28/42/23/7	0,54±0,02	0,46±0,02	oui
POPC/Chol/PI/PIP ₂ 28/42/23/7	0,63±0,02	0,53±0,02	oui pour $T \geq 20$ °C
POPC/Chol/PI/PIP/PIP ₂ 28/42/16/7/7	0,62±0,02	0,57±0,02	non
« NERs »	0,53±0,02	0,50±0,02	oui

Tableau V-6 Tableau récapitulatif des paramètres d'ordre $2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ pour les différents systèmes étudiés. « NERs » : POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃ 28/42/11/7/7/5.

V.5.1 Propriétés biophysiques de membranes enrichies en phosphoinositides et en cholestérol

a) Effets des PPIs et du cholestérol sur la dynamique membranaire

Nos résultats ont indiqué la présence d'une phase liquide ordonnée pour tous les modèles étudiés contenant du cholestérol et ce sur toute la gamme de températures. La phase liquide ordonnée est engendrée par la présence de cholestérol (Vist et Davis, 1990 ; Dufourc, 2008). Nous pouvons en conclure que nous conservons donc « l'effet cholestérol » en présence de phosphoinositides. Ceci est en accord avec les observations faites sur les membranes naturelles NERs, qui révélaient la présence d'une phase liquide ordonnée (Garnier et al., 2009).

En présence de PI, nous n'avons constaté aucun effet sur le système POPC/Chol jusqu'à 10°C, puis une diminution de l'ordre à partir de 20°C (Tableau V-6). Nous avons précédemment montré que PI augmentait la fluidité d'une membrane de POPC sur toute la gamme de températures. Cet effet est donc conservé en présence de cholestérol mais de manière moins prononcée. Le cholestérol contrebalance de manière importante l'effet fluidifiant de PI.

Nous avons ensuite étudié le système POPC/Chol/PI/PIP. Ce modèle présente une dynamique globale plus importante que les systèmes POPC/Chol et POPC/Chol/PI (Tableau V-6). Les paramètres d'ordre locaux au niveau des régions du « plateau » et des méthyles ont montré un effet complexe le long de la chaîne de POPC. En effet, nous avons constaté que PIP n'a que peu d'effet sur la dynamique au niveau du « plateau », tandis que ce même lipide induit un fort effet de désordre au niveau des méthyles lorsque l'on compare avec les résultats obtenus pour le système POPC/Chol/PI. Lors du chapitre précédent, nous avons observé que PIP n'avait pas d'effet au niveau de la dynamique sur le système POPC/PI tout au long de la chaîne de POPC. Nous observons donc la même tendance au niveau de la région « plateau ». L'augmentation de la dynamique au niveau des méthyles pourrait provenir d'un effet de désordre des phosphoinositides (du fait des insaturations sur la chaîne *sn2*) contrebalançant dans une certaine mesure « l'effet cholestérol » au niveau des méthyles.

PIP₂ présente un effet différent de PIP sur le modèle POPC/Chol/PI. En effet, PIP₂ présente un effet d'ordre sur une membrane de POPC/Chol/PI de -5 °C à 10°C, puis n'a plus d'effet sur la dynamique à partir de 20 °C (Tableau V-6). Nous avons ensuite étudié un système composé de POPC, de cholestérol, de PI, de PIP et de PIP₂. Ce système indique une

augmentation de l'ordre comparé à POPC/Chol/PI (Tableau V-6). En l'absence de cholestérol, un effet combiné de PI, PIP et PIP₂ fluidifiant avait été observé.

Bien que surprenant, nous avons déjà constaté un effet similaire en absence de cholestérol (chapitre IV). Ce phénomène avait été attribué à l'apparition d'un domaine enrichi en PIP₂ et stabilisé par liaisons hydrogène. Ceci pourrait de nouveau s'expliquer nos observations en présence de cholestérol. La présence de domaines dans nos membranes pourrait expliquer l'effet d'ordre observé pour les systèmes POPC/Chol/PI/PIP₂ et POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂. En effet, nous savons que la stabilisation par liaisons hydrogène de domaines enrichis en phosphoinositides est plus importante pour PIP₂ que pour PIP et PI (Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Gericke, 2005). De plus, nous pouvons facilement envisager que plus le nombre de liaisons H est important, moins la diffusion latérale au sein de ces domaines est importante, résultant donc en une diminution de la dynamique au sein de ce domaine. Si les domaines enrichis en PIP₂ sont moins dynamiques que le reste du système, cela va alors induire une augmentation de l'ordre globale du système. Il est important de mentionner que dans le chapitre précédent, nous avons observé un effet fluidifiant combiné de PI, PIP et PIP₂ sur POPC. En présence de cholestérol, nous observons donc le contraire. Ceci pourrait s'interpréter par un effet de concentration. Le pourcentage total de PPIs est supérieur dans le modèle sans cholestérol impliquant une concentration de charge à la surface de la membrane plus importante. Dans ce cas, la répulsion électrostatique pourrait reprendre le dessus ce qui aurait pour conséquence d'écarter les lipides les uns des autres impliquant une augmentation du désordre. Ceci montrerait de nouveau une balance subtile entre la stabilisation par liaisons hydrogène et la déstabilisation par répulsion électrostatique. La différence de comportement entre les deux systèmes pourrait également s'expliquer par un effet stabilisant du cholestérol sur le réseau de liaisons hydrogène. Cette situation semble néanmoins peu probable. En effet, nous avons observé une baisse des anisotropies de déplacement chimique des phosphores présents dans PI, PIP, PIP et PIP₂ dans le système contenant du cholestérol comparé à celui sans cholestérol. Le rôle « espaceur » du cholestérol entre les têtes polaires est donc conservé sur les PPIs, indiquant que le cholestérol s'intercalerait également entre les PPIs. Ceci aurait plutôt tendance à éloigner les PPIs les uns des autres et donc à diminuer la faculté de ces lipides à former des liaisons hydrogène.

b) Effet des PPIs sur la dynamique à l'interface d'une membrane riche en cholestérol

Nous avons observé que la présence du cholestérol et des phosphoinositides modifie la dynamique et l'orientation des têtes polaires de POPC. En effet, nous passons d'un $\Delta\sigma$ de -

47,0±1,5 pour POPC seul, à un $\Delta\sigma$ de -40±1,5 ppm en présence de cholestérol et un $\Delta\sigma$ de -35±1,5 ppm en présence de cholestérol et de phosphoinositides. La présence de cholestérol diminue l'anisotropie de déplacement chimique du PC. Comme déjà décrit dans la littérature, ceci est attribué au fait que le cholestérol s'intercale entre les lipides au niveau de la partie hydrophobe avec son groupe OH situé face aux carbonyles des chaînes d'acide gras. Ceci a pour conséquence de libérer de l'espace au niveau des têtes polaires (Vist et Davis, 1990 ; Pott et al., 1995 ; Leonard et al., 2001). Une diminution supplémentaire est observée en présence des PPIs, traduisant une augmentation de la dynamique des phosphores et un changement d'orientation par rapport au système POPC/Chol.

Toutes les anisotropies de déplacements chimiques des PPIs ont également diminué en présence de cholestérol, suggérant que l'effet du cholestérol est conservé sur les PPIs. Nous avons néanmoins remarqué, sur les différents systèmes étudiés, une invariance des $\Delta\sigma$. En effet, par exemple, PI présente le même $\Delta\sigma$ qu'il soit dans POPC/Chol ou dans le système « NERs ».

Ces résultats indiquent que les PPIs conservent leur orientation mais qu'ils imposent l'orientation de PC. Nous avons déjà mentionné cette invariance dans les modèles « MV1 » (sans cholestérol), que nous avons interprétée comme une indication de la formation de domaines de PPIs stabilisée par les liaisons hydrogène.

c) Le modèle « NERs »

Le modèle « NERs » composé de POPC, PI, PIP, PIP₂ et PIP₃ présente un environnement plus dynamique que POPC/Chol, tout en conservant la phase liquide ordonnée. La présence de ces PPIs induit dans ce cas une augmentation de la fluidité. Par conséquent, il semblerait que nous n'ayons pas de fortes stabilisations par liaisons hydrogène. En raison du fort pourcentage de PPIs (30% molaire dont 12 % de PIP₂ et PIP₃, fortement chargés), nous pouvons supposer que la répulsion électrostatique redevient prédominante sur la stabilisation par liaisons hydrogène, engendrant alors un effet de désordre. De plus, dans ce cas, le cholestérol pourrait apporter une déstabilisation supplémentaire en s'intercalant entre les PPIs.

Nous avons déterminé que les anisotropies de déplacement chimique des PPIs restent inchangées, comparé aux autres modèles. Comme pour les systèmes plus simples, ceci pourrait se traduire par la formation de domaines enrichis en PPIs. La déstabilisation par

répulsion électrostatique, mentionnée précédemment, ne détruirait donc pas les domaines mais engendrerait un effet de désordre au sein de ceux-ci.

Nos résultats ont révélé que le modèle « NERs » présente une phase liquide ordonnée, plus fluide en présence des PPIs. Ceci concorde avec les observations faites sur les NERs naturels qui montraient un certain désordre malgré la forte proportion de cholestérol (Garnier et al., 2009). A ce stade, il apparaît intéressant de comparer les paramètres d'ordre obtenus pour le système « NERs » aux paramètres d'ordre de modèles membranaires composés de POPC et de cholestérol.

La figure V-8 représente l'évolution des paramètres d'ordre de modèles membranaires composés de POPC et de cholestérol pour des proportions molaires de 0%, 5%, 15%, 30% et 50% (Garnier-Lhomme et al., 2009) et 42% (ce chapitre) en cholestérol. Nous avons représenté en rouge le modèle « NERs » composé de POPC, Chol et PPIs. Nous observons que les paramètres d'ordres de ce système se situent entre les compositions contenant 15% et 30% de cholestérol. La présence de phosphoinositides contrebalance donc en partie l'effet cholestérol (entre 30% et 60%) sur un système POPC/Chol. Ceci se traduit alors par une augmentation du désordre au sein du modèle « NERs » comparé à des systèmes purement constitués de PC et de cholestérol. L'effet cholestérol en fonction de la concentration montre un comportement plus complexe au niveau méthyles notamment à basse température. Ceci ne constitue pas l'objet de ce travail, nous ne détaillerons pas ce phénomène. Nous pouvons néanmoins remarquer qu'à partir de 10°C, nous retrouvons des paramètres d'ordre $2S_{CD\text{méthyles}}$ compris entre ceux obtenus pour des systèmes contenant 15% et 30% de cholestérol. Nous obtenons donc le même effet des PPIs sur la phase liquide ordonnée au niveau de la région « plateau » et de la région des méthyles. L'effet fluidifiant des PPIs sur une membrane POPC/Chol est donc ressenti en profondeur dans la membrane.

Le modèle « NERs » a apporté des informations précieuses concernant les propriétés membranaires de cette membrane et qui corrélaient bien avec ce que Garnier-Lhomme et al. avaient observé dans les NERs natifs. Nous allons maintenant discuter de l'effet de la composition lipidique des NERs sur les propriétés biologiques de ces membranes.

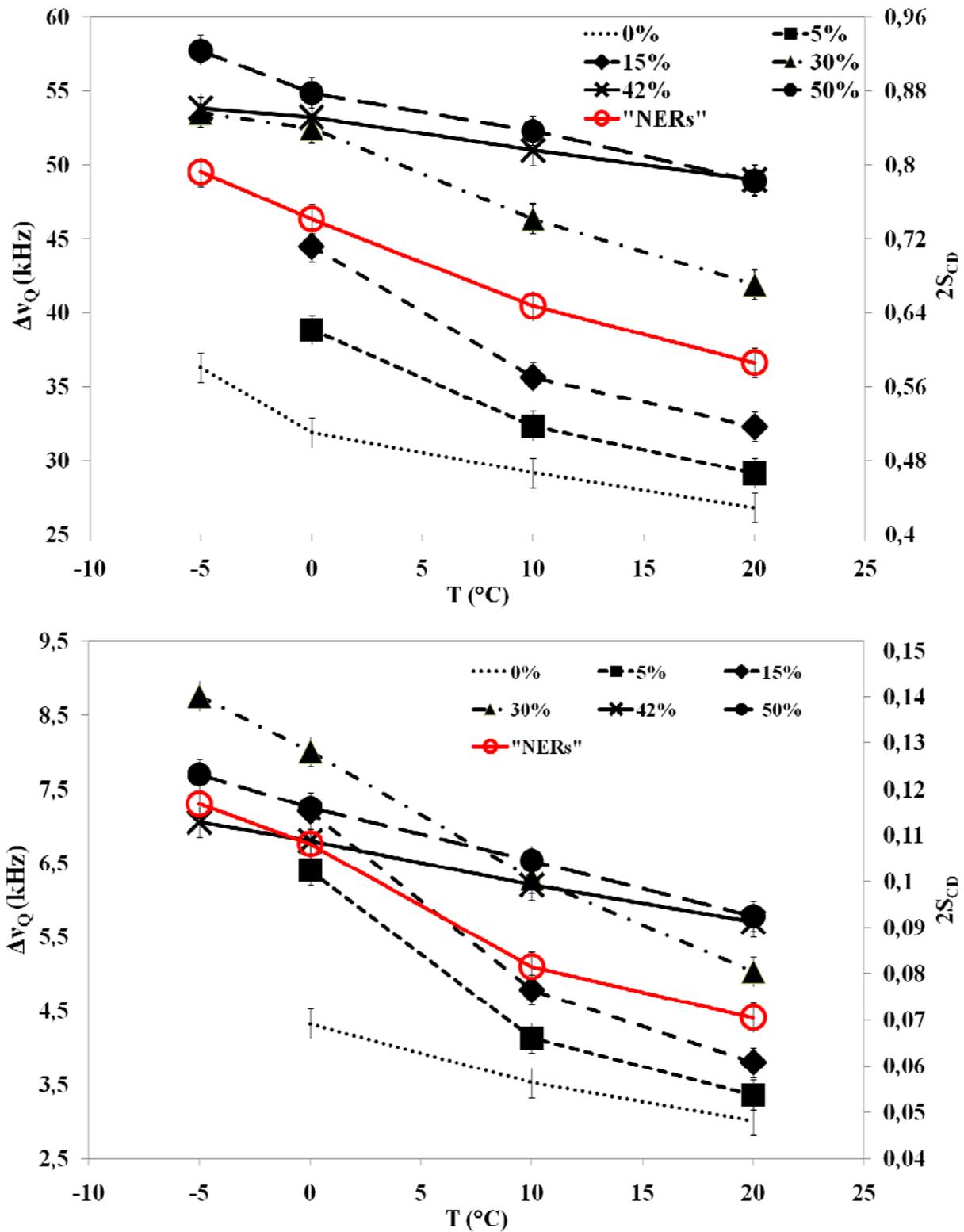


Figure V-8 Comparaison entre les éclatements quadrupolaires (et paramètres d'ordre) au niveau de la région « plateau » (a) et de la région des méthyles (b) de différents modèles membranaires contenant des proportions croissantes en cholestérol. Les modèles contenant 0%, 15%, 30% et 50% sont tirés d'études précédentes (Garnier et al., 2009). Les modèles POPC/Chol 52/48 et « NERs » proviennent de ce travail.

V.5.2 Implications biologiques

Les NERs gèrent l'arrimage de deux populations de vésicules membranaires de l'ovocyte fécondé (MV1 et MV2) puis fusionnent avec celles-ci afin de former l'enveloppe nucléaire (Collas et Poccia, 1995b). De plus, on suppose un rôle des NERs dans l'organisation de la chromatine au niveau des pôles (Garnier, 2007). Ces membranes sont par conséquent essentielles à la formation de l'enveloppe nucléaire.

La résistance au détergent des NERs indique que ces membranes ont des propriétés membranaires particulières. Les NERs contiennent 42 % (molaire) de cholestérol et 30% (molaire) de phosphoinositides et il a été montré que ces membranes se trouvent en phase liquide ordonnée fluide (Garnier et al., 2009). Nos études par RMN des solides ont montré que le modèle membranaire « NERs » se trouvait également en phase liquide ordonnée et correspondait à la présence de cholestérol dans nos membranes. Bien avant la connaissance des NERs, des membranes résistantes à la solubilisation par détergent ont été mises en évidence. Ces membranes, enrichies en cholestérol et en sphingolipides, présentent une phase liquide ordonnée (Ge et al., 1999 ; Brown et London, 2000, London et Brown, 2000). Des modèles membranaires mimant la composition de ces membranes résistantes se trouvent également en phase lo et sont insolubles aux détergents (Ge et al., 1999 ; London et Brown, 2000 ; Brown et London, 2000 ; Dufourc, 2008). La phase liquide ordonnée a donc été associée à la résistance aux détergents (Brown et London, 2000 ; Edidin, 2003). De ce fait, la résistance des NERs face à la solubilisation par détergent proviendrait de la présence d'une phase liquide ordonnée dans ces membranes.

La faculté des NERs à rester accrochés au noyau suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire *in vivo*, pourrait en partie être expliquée par la structure particulière de ces membranes. En effet, la stabilité importante des NERs, de part la présence d'une phase liquide ordonnée, permettrait à ceux-ci de résister aux perturbations environnantes menant à la rupture du reste de l'enveloppe nucléaire. De plus, un certain nombre de protéines participant à l'accroche des NERs sur le noyau pourraient se concentrer préférentiellement dans la phase ordonnée. Ceci expliquerait également la résistance des NERs à la rupture de l'enveloppe nucléaire en comparaison du reste de la membrane ainsi que le rôle éventuel des NERs dans l'organisation de la chromatine.

Nous avons observé que le modèle « NERs » est relativement désordonné pour un système riche à plus de 40% en cholestérol. Lors de la formation de l'enveloppe nucléaire, les

NERs fusionnent avec les vésicules MV1. Nous savons que la fluidité est un paramètre important pouvant influencer les mécanismes de fusion membranaire. En effet, nous avons précédemment rappelé que la fluidité membranaire est liée à l'épaisseur membranaire, qui est, elle-même, en relation avec la rigidité de déformation de la membrane (Douliez et al., 1995 ; Douliez et al., 1996 ; Goetz et al., 1999 ; Rawicz et al., 2000). En résumé, plus une membrane est fluide, plus son épaisseur est faible et par conséquent plus sa résistance aux déformations est faible. Nous savons que les intermédiaires de fusion comme les « stalks » et les pores de fusion nécessitent d'importantes déformations membranaires (Chernomordik, 1996 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008). Ceci implique que sous certaines conditions bien spécifiques, une membrane fluide aura donc plus de facilité à aller vers la fusion membranaire qu'une autre plus rigide. Les « NERs » sont en phase liquide ordonnée. Cependant, la présence de PPIs augmente la fluidité dans ces membranes tout en conservant la structure liquide ordonnée permettant aux NERs de rester accrochés au noyau. Les phosphoinositides moduleraient donc la fluidité des NERs naturels afin de préparer ces membranes à la fusion.

Les NERs apparaissent donc comme des membranes dans lesquelles nous avons un équilibre entre une certaine rigidité permettant la résistance à la rupture de l'enveloppe nucléaire et une certaine fluidité permettant à la membrane de se déformer pour fusionner. Ces propriétés seraient en partie engendrées par un enrichissement spécifique en certains lipides, le cholestérol et les phosphoinositides dans notre cas. Il est donc envisageable que des variations de concentration au sein de ces lipides pourraient engendrer des dysfonctionnements des NERs (perte de phase liquide ordonnée ou augmentation de la fluidité non conséquente) et donc de la formation de l'enveloppe nucléaire.

Nous avons montré que les phosphoinositides (PIP, PIP₂ et PIP₃) présenteraient une courbure spontanée positive (chapitre III). De tels lipides auraient la capacité de stabiliser l'ouverture du pore de fusion, étape finale de la fusion membranaire (Zimmerberg et al., 1993 ; Chernomordik et al., 1995 ; Chernomordik, 1996 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Frolov and Zimmerberg, 2010). Par conséquent, les phosphoinositides des NERs faciliteraient la fusion des NERs avec les MV1 en augmentant la fluidité des NERs et en favorisant l'ouverture du pore de fusion.

V.6 Conclusions

Nous avons étudié plusieurs modèles membranaires permettant d'étudier l'enrichissement en cholestérol et en phosphoinositides des NERs. Ces modèles ont révélés la

présence d'une phase liquide ordonnée dû à la présence de cholestérol et un effet de fluidification de la phase liquide ordonnée (tout en la conservant) par les phosphoinositides. Il a été montré que la présence d'une phase liquide ordonnée ainsi que la fluidification de celle-ci permettent d'expliquer en partie les propriétés biologiques des NERs comme la résistance de ces structures à la rupture de l'enveloppe nucléaire et la capacité de fusion de ces membranes. Il est maintenant intéressant de coupler les observations obtenues pour chaque compartiment membranaire (MV1, MV2 et NERs) entre elles et de les intégrer dans les mécanismes proposés de la formation de l'enveloppe nucléaire. Ceci fera l'objet du prochain chapitre.

VI. Implications Biologiques et Conclusions Générales

VI.1 Introduction

Lors de la division cellulaire et de la fécondation, l'enveloppe nucléaire se rompt puis se reforme. Des malformations au niveau de l'enveloppe nucléaire sont généralement associées à des pathologies graves comme des dystrophies ou différents cancers (Fisher et al., 2004 ; Zink et al., 2004; Somech et al., 2005 ; Worman et Bonne, 2007 ; Webster et al, 2009). Il apparaît donc essentiel d'appréhender les mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire afin de comprendre l'origine de ces maladies. D'importantes avancées dans la compréhension de ce processus ont été possibles grâce au développement d'un système *in vitro* dérivant de gamètes d'oursins permettant d'étudier la formation de l'enveloppe nucléaire (Cameron et Poccia, 1994). A partir de ce système, il a été observé que la formation de l'enveloppe nucléaire se faisait de manière séquentielle, impliquant des étapes de décondensation de la chromatine, d'arrimage des vésicules précurseurs de l'enveloppe nucléaire, MV1 et MV2, sur le noyau et enfin de fusion de ces vésicules entre-elles et avec les NERs (Collas et Poccia, 2000 ; Larijani et Poccia, 2007 ; Larijani et Poccia, 2009). Les membranes MV1 et NERs sont primordiales pour la formation de l'enveloppe nucléaire. L'analyse de la composition lipidique de ces membranes a révélé un important enrichissement en phosphoinositides insaturés (60% des phospholipides) (Byrne et al., 2007 ; Garnier-Lhomme et al., 2009), lipides le plus souvent présents en faible proportion dans les membranes naturelles (Di Paolo et Di Camilli, 2006). De ce fait, il est apparu pertinent de vérifier si le rôle de ces membranes dans la formation de l'enveloppe nucléaire pouvait être relié à leur composition lipidique et plus particulièrement à la présence de phosphoinositides. Cette étude s'est décomposée en trois parties distinctes et complémentaires.

Dans un premier temps, nous avons étudié par RMN des solides et par cryomicroscopie électronique des modèles membranaires constitués exclusivement de PPIs insaturés. Ces études ont révélés que les PPIs induisent une courbure membranaire positive favorisant la formation d'entités membranaires de petite taille. Cette tendance semble plus prononcée pour les PPIs polyphosphorylés fortement chargés tels que PIP₂ et PIP₃ et modulée en fonction du pH et de la température. Nous avons également montré que les PPIs engendrent un environnement membranaire très fluide.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié par RMN des solides des modèles membranaires mimant la composition lipidique des vésicules MV1 (riches en PPIs). Plusieurs modèles ont été construit afin d'étudier, de manière séquentielle, l'implication de chaque PPIs présents dans les vésicules MV1 (chapitre IV).

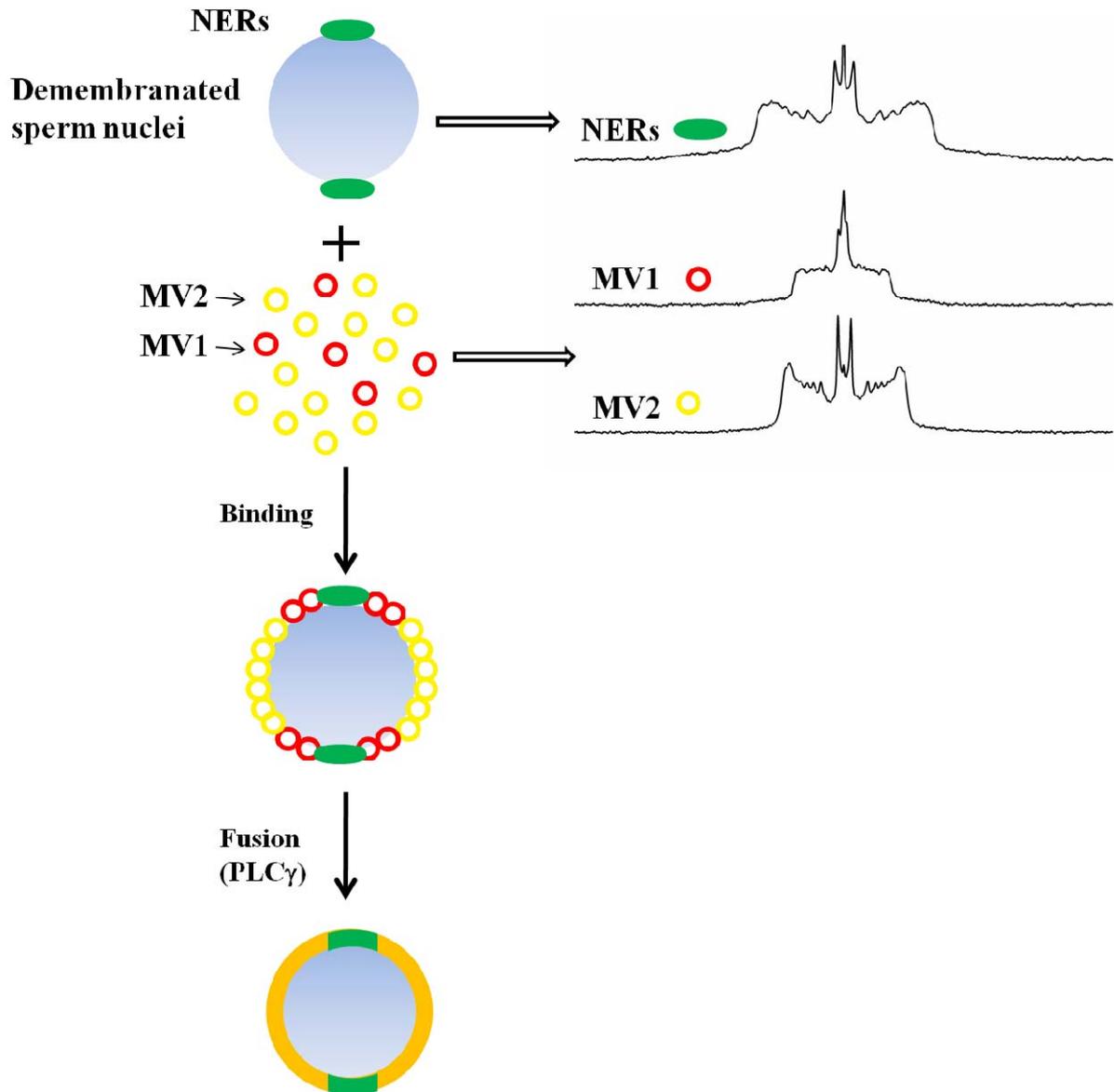


Figure VI-1 Schéma explicatif de l'implication des propriétés physiques des NERs, des MV1 et des MV2 dans la formation de l'enveloppe nucléaire. Les NERs (rigides) sont localisés au niveau des pôles du noyau de spermatozoïde. Les MV1 (très fluides) viennent se lier au niveau des NERs tandis que les MV2 (fluidité intermédiaire) se lient sur toute la surface du noyau. Ensuite, PLC γ convertit PIP $_2$ en DAG ce qui va induire la fusion entre les vésicules et les NERs nécessaire à la formation de l'enveloppe nucléaire. Les NERs sont intégrés dans l'enveloppe nucléaire. A droite: spectres expérimentaux de RMN des solides ^2H de modèles membranaires mimant les compositions lipidiques des NERs, des MV2 et des MV1 (plus le spectre est large, plus le système est ordonné).

Ces études ont révélé un comportement complexe de fluidification et de rigidification des PPIs du fait de leur forte propension à former un réseau de liaisons hydrogènes entre eux. Nous avons également montré que le modèle « MV1 » présente une dynamique membranaire très importante, résultant d'effets compensatoires de désordre et d'ordre des PPIs polyinsaturés. Ces lipides présentent donc la capacité de moduler la fluidité membranaire.

Enfin, nous avons construit des modèles membranaires reproduisant la composition lipidique des NERs, portions de membranes associées aux pôles du noyau des spermatozoïdes, riches en cholestérol et en phosphoinositides (Garnier-Lhomme et al., 2009). Nous avons montré que les PPIs ont la faculté de réduire l'effet d'ordre du cholestérol, tout en conservant la phase liquide ordonnée. C'est la première fois que de tels lipides sont mis en évidence.

Ces propriétés nouvelles, que nous avons mises en évidence, permettent de proposer un mécanisme de formation de l'enveloppe nucléaire dans lequel les membranes MV1 et NERs jouent des rôles structuraux et dynamiques complémentaires (Figure IV-1). Les NERs, localisés au niveau des pôles du noyau des spermatozoïdes, sont des membranes ordonnées, dont la rigidité serait modulée par la présence des PPIs. Les processus de fusion membranaire entre les vésicules et les NERs, nécessaires à la formation de l'enveloppe nucléaire, sont déclenchés par l'activation de PLC γ dans les MV1, qui convertit alors PIP $_2$ en DAG. L'enrichissement en PPIs des membranes MV1 et NERs, engendrant une importante fluidité membranaire et courbure positive, faciliteraient ces processus de fusion membranaire. Ces différents points vont faire l'objet de la discussion.

VI.2 Les NERs, essentiels à l'arrimage des vésicules MV1 et MV2, sont des membranes en phase liquide ordonnée

L'arrimage, autour du noyau, des vésicules membranaires précurseurs de l'enveloppe nucléaire, MV1 et MV2, constitue une étape essentielle dans la formation de l'enveloppe nucléaire (Figure VI-1). Les vésicules MV1 se lient exclusivement au niveau des NERs, tandis que les vésicules MV2 s'arriment au niveau des NERs (MV2 α) ainsi que sur toute la surface du noyau (MV2 β). Les NERs ont donc un rôle clé dans la formation de l'enveloppe nucléaire. Comme nous l'avons mentionné précédemment, *in vitro*, les NERs sont retenus aux pôles du noyau des spermatozoïdes après solubilisation de la membrane nucléaire avec un détergent. Ceci suggère une forte association entre la chromatine et les NERs impliquant des interactions entre protéines et/ou une configuration membranaire particulière. L'étude des membranes NERs par RMN des solides (^2H et ^{31}P) a révélé la présence d'une phase liquide

ordonnée, aussi bien dans les membranes naturelles (Garnier-Lhomme et al., 2009) que dans les modèles membranaires mimant la composition lipidique des NERs (chapitre V). La propriété de résistance des membranes aux détergents est généralement associée à une phase liquide ordonnée (Ge et al., 1999 ; Brown et London, 2000 ; London et Brown, 2000 ; Edidin, 2003). L'existence de membranes (ou domaines membranaires) résistantes aux détergents dans les cellules a largement été controversée en raison des artefacts possibles d'extraction par détergent et de la difficulté de les observer *in situ* (Brown et London, 2000 ; London et Brown, 2000). Cependant, dans notre cas, le fait que les NERs aient été observés *in vivo* chez plusieurs espèces et qu'ils soient essentiels à la formation de l'enveloppe nucléaire aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Longo et Anderson, 1968 ; Collas et Poccia, 1995b) permet d'avancer qu'ils ne constituent pas un artefact de solubilisation de l'enveloppe nucléaire, mais bien des membranes naturelles actives.

Nos études ont révélé que la présence de la phase liquide ordonnée est due à la forte proportion de cholestérol dans ces membranes (Figure VI-2). Ceci avait déjà été démontré dans de nombreux systèmes membranaires (Vist et Davis, 1990 ; Faure et al., 1996 ; McMullen et al., 2004 ; Beck et al., 2007 ; Dufourc, 2008). Cependant, il était intéressant de le confirmer pour des ratios phospholipides/cholestérol similaires à ceux déterminées dans les membranes NERs. Nous avons également montré que la présence des PPIs polyinsaturés ne déstabilise pas la phase liquide ordonnée. Néanmoins, en présence de PPIs, cette phase liquide ordonnée est plus désordonnée que celle obtenue pour un système équivalent en cholestérol sans phosphoinositides. Ceci est illustré dans la figure IV-2 qui compare les paramètres d'ordre obtenus au niveau de la région « plateau » des systèmes « NERs » et POPC/Chol.

D'après nos résultats et ceux de Garnier-Lhomme (Garnier-Lhomme et al., 2009), nous pouvons avancer que la présence en forte proportion de cholestérol dans les NERs résulterait de la nécessité d'être en phase liquide ordonnée. En effet, cette spécificité engendre la propriété d'insolubilité aux détergents des NERs observée *in vitro*. Nous pouvons également présumer que cette phase engendrerait un environnement membranaire favorisant les interactions protéiques nécessaires à l'association des NERs avec la chromatine. Les protéines impliquées dans ce processus pourraient alors se concentrer préférentiellement dans la phase liquide ordonnée. Ceci expliquerait le fait que les NERs restent accrochés à la chromatine et servent d'ancre à celle-ci.

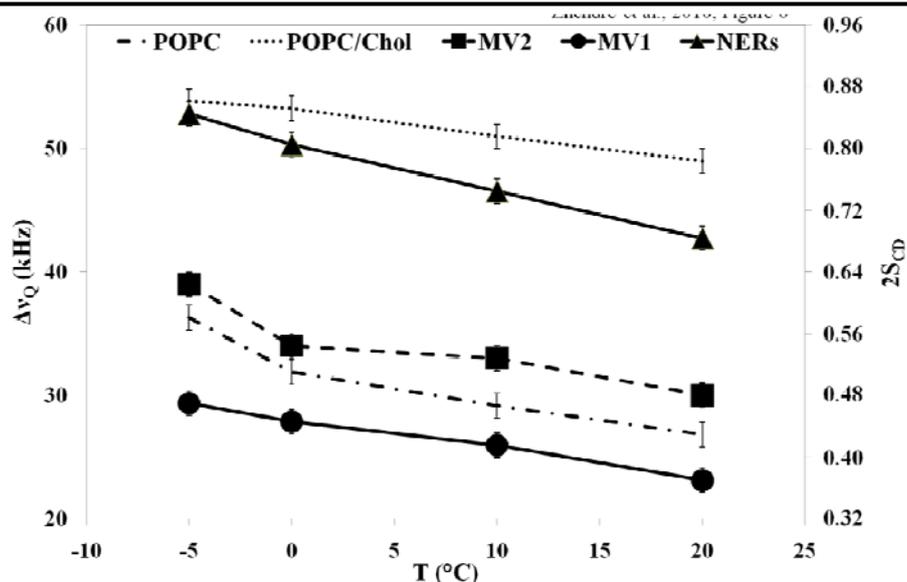


Figure VI-2 Comparaison des paramètres d'ordre de la région « plateau » dans les membranes NERs, les MV2 et les MV1. Variation thermique de l'éclatement quadrupolaire au niveau de la région « plateau » (de la position 2 à 8-10 sur la chaîne aliphatique deutérée) de modèles membranaires mimant la composition lipidiques des MV1 (POPC/PI/PIP/PIP₂/PIP₃), MV2 (POPC/Chol/POPE/PI/POPS) et NERs (POPC/Chol/PI/PIP/PIP₂/PIP₃). Les résultats obtenus pour POPC et POPC/Chol sont également montrés à titre de comparaison. L'erreur de mesure est estimée à ± 1 kHz. Sur le second axe Y est représenté le paramètre d'ordre $2S_{CD}$ correspondant.

VI.3 Les PPIs peuvent faciliter les mécanismes de fusion membranaire en agissant sur la dynamique et la courbure membranaire

VI.3.1 Les MV1 sont des membranes très fluides, favorisant leur interaction avec les NERs

Nous avons mentionné que les MV1 s'arriment au niveau des NERs (Figure VI-1). Tout comme les NERs, les vésicules MV1 présentent un enrichissement en phosphoinositides important (Byrne et al., 2007). Notre étude sur des modèles membranaires mimant la composition lipidique des MV1 a révélé que ces membranes présentent une grande fluidité membranaire (Figure VI-2). L'effet de fluidification globale de la membrane résulte de la présence en forte proportion des PPIs polyinsaturés. Ceci indique que les NERs et les MV1 constituent deux compartiments membranaires interagissant ensemble et qui présentent des propriétés membranaires différentes. Nous pouvons supposer qu'un tel environnement fluide dans les vésicules MV1 faciliterait leurs interactions avec les NERs plus rigides, permettant ainsi l'arrimage des MV1 au niveau des NERs.

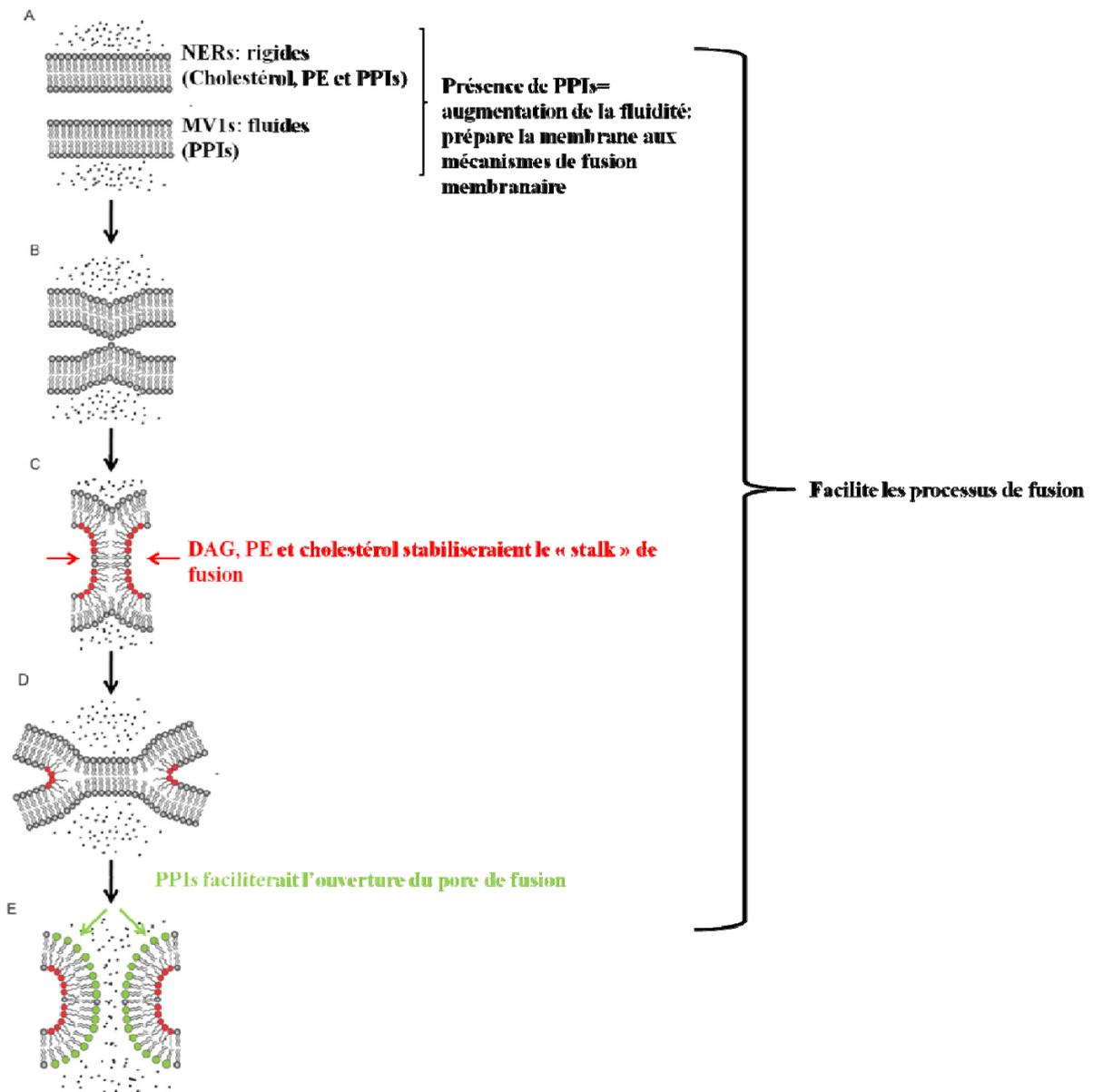


Figure VI-3 Schéma explicatif du rôle des lipides présents dans les membranes MV1 et NERs dans les processus de fusion membranaire (adapté de Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Larijani et Poccia, 2009). Les points noirs représentent le contenu des compartiments membranaires. (A) deux membranes séparées par 10-20 nm. (B) Les membranes devant fusionner rentrent en contact. (C) Formation du Stalk de fusion. (D) Expansion du stalk pour former le diaphragme d'hémifusion. (E) Ouverture du pore de fusion et mélange des contenus membranaires.

Après l'arrimage des vésicules MV1 et MV2 autour du noyau, la formation de l'enveloppe nucléaire implique des processus de fusion entre ces différentes vésicules et les NERs (Cameron et Poccia, 1994 ; Collas et Poccia, 1996) (Figure VI-1). Les MV1 semblent être la population de vésicules qui déclenche les phénomènes de fusion membranaire (Collas et Poccia, 1996 ; Byrne et al., 2007 ; Dumas et al., 2010). La fusion entre les vésicules serait régie par la production de DAG suite à l'hydrolyse de PIP₂ par PLC γ dans les MV1 (Byrne et al., 2007 ; Dumas et al., 2010).

VI.3.2 L'enrichissement en PPIs dans MV1 et NERs prépare les membranes aux processus de fusion

Nos études sur des modèles membranaires mimant la composition lipidique des MV1 ont indiqué que ces membranes constituaient des membranes très fluides. Nous pouvons supposer que cette caractéristique rendrait ces membranes encore plus sensibles à la production de DAG, en instaurant un environnement favorable aux mécanismes de fusion membranaire. Plus une membrane est fluide, plus elle a la capacité de se déformer et par conséquent de former les intermédiaires de fusion (Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Frolov et Zimmerberg, 2010). La présence de phosphoinositides au sein des MV1 préparerait alors ces membranes aux processus de fusion en engendrant un environnement fluide propice aux déformations (Figure VI-3). Il est important de rappeler que nous avons observé des effets complexes de PPIs au niveau de la fluidification. Nous pouvons mentionner, par exemple, un effet de fluidification de PIP₂ sur une membrane de PC, mais un effet d'ordre sur une membrane de PC/PI. Le contraire a été observé pour PIP₃, c'est-à-dire, un effet d'ordre de PIP₃ sur PC mais un effet de fluidification sur PC/PI. De part ces effets complexes, nous pouvons donc envisager que des variations en concentration de ces lipides dans les vésicules MV1 pourraient moduler de façon importante la propension de ces membranes à la fusion membranaire.

Nous avons également montré que la présence des PPIs dans les NERs contrebalance en partie l'effet d'ordre du cholestérol, tout en conservant la phase liquide ordonnée (condition nécessaire pour les NERs afin de résister à la solubilisation de l'enveloppe nucléaire). L'augmentation de la fluidité (comparée à une membrane équivalente sans PPIs) conférerait aussi aux NERs la propriété d'être plus réactifs aux mécanismes de fusion membranaire (Figure VI-3). Comme il est proposé pour les vésicules MV1, nous pouvons envisager que des variations de la concentration de ces lipides, pourraient moduler la propension à la fusion de ces membranes.

A ce stade, il apparaît important de déterminer sans ambiguïté si les phosphoinositides se trouvent dans les membranes de NERs et de MV1 sous forme de domaines ou s'ils sont distribués de manière homogène. Les PPIs ont la faculté d'interagir aussi bien entre eux qu'avec les molécules d'eau avoisinantes par le biais de liaisons hydrogènes (Carrier et Wong, 1996 ; Liepina et al., 2003 ; Levental et al., 2008a ; Levental et al., 2008b). Ce réseau de liaisons hydrogènes faciliterait l'apparition de domaines enrichis en PPIs au sein de la membrane, en contrebalançant les phénomènes de répulsion électrostatique entre ces lipides (Liepina and al., 2003 ; Redfern et Gericke, 2004 ; Redfern et Guericke, 2005 ; Hermelink et Brezensinski, 2008 ; Kooijman et al., 2009). Nos résultats sur les modèles membranaires laissent également supposer l'existence de liaisons hydrogènes entre les PPIs, ceci aussi bien dans les systèmes purs (stabilisant ainsi la phase lamellaire par rapport à la phase isotrope : chapitre III) que dans les systèmes multiples (expliquant les effets complexes de fluidification ou de rigidification observés pour certains systèmes : chapitre IV et chapitre V). De plus, nos résultats ont indiqué que l'environnement des phosphores des PPIs reste inchangé, que les PPIs soient seuls ou mélangés avec d'autres lipides. Nous avons également mis en évidence que ces lipides influent sur la dynamique orientationnelle des autres lipides présents dans la membrane. Ces deux constatations laissent de nouveau présager un clustering des PPIs. Des domaines enrichis en PPIs et stabilisés par des interactions (spécifiques ou non spécifiques) avec des protéines contenant des résidus chargés positivement ont déjà été mis en évidence aussi bien dans des modèles de membranes que dans des membranes naturelles (Janmey et al., 1999 ; McLaughlin et al., 2002 ; Janmey et Lindberg, 2004 ; McLaughlin and Murray, 2005 ; Gamper et Shapiro, 2007 ; Golebiewska et al., 2008). Ces domaines seraient impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que l'attache du cytosquelette à la membrane plasmique ou encore le trafic membranaire.

Ceci renforce l'idée que de tels domaines pourraient exister dans les MV1 et les NERs. Ces derniers seraient stabilisés par un réseau de liaisons hydrogènes et par des interactions avec des protéines interagissant avec les PPIs (via des interactions électrostatiques avec des protéines contenant des domaines de résidus basiques par exemple : McLaughlin et al., 2002). Nous pouvons alors supposer que ces domaines enrichis en PPIs serviraient de plateforme de recrutement (ou de concentration) de protéines impliquées dans les processus d'attache entre les NERs et les MV1, ainsi que dans les processus de fusion consécutifs à l'attache des vésicules.

VI.3.3 La présence des PPIs dans MV1 et NERs permettrait de stabiliser l'ouverture du pore de fusion

Sous activation de PLC γ , il y a formation de DAG dans les MV1 (Byrne et al., 2007). DAG est un lipide à courbure spontanée négative (Basanez et al., 1996). De tels lipides peuvent être impliqués dans les processus de fusion membranaire en favorisant la formation du « stalk » de fusion (intermédiaire de fusion à courbure négative) (Basanez et al., 1996 ; Goñi et Alonso, 1999 ; Villar et al. 2000 ; Villar et al., 2001 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Churchward et al., 2006 ; Chernordik et Kozlov, 2008 ; Lang et al., 2008). Il a donc été avancé que la production de DAG permettrait d'initier la fusion entre les vésicules et les NERs en déstabilisant localement la membrane (Figure VI-3). Nous avons vu précédemment que les NERs sont fortement enrichis en cholestérol, induisant une phase liquide ordonnée, nécessaire à la stabilité requise pour le maintien des NERs aux pôles du noyau. Le cholestérol pourrait également faciliter la fusion entre les vésicules et les NERs (Garnier-Lhomme et al., 2009). En effet, le cholestérol présente aussi une courbure de membrane négative (Churward et al, 2005). Le cholestérol présent dans les NERs pourrait ainsi contribuer à déstabiliser localement ces membranes et faciliter leur fusion avec les vésicules en facilitant la formation du « stalk » de fusion (Figure VI-3).

Notre étude sur le polymorphisme des PPIs, combinant la RMN des solides et la cryo-microscopie, a indiqué que ces lipides présentent une courbure spontanée positive (en particulier PIP₂ et PIP₃). De tels lipides pourraient être impliqués dans les mécanismes de fusion. Des travaux ont montré que les lipides à courbure spontanée positive favoriseraient l'ouverture du pore de fusion (dont la courbure globale est positive) lorsqu'ils étaient présents dans les monocouches distales des bicouches (Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Chernomordik et Kozlov, 2008 ; Lang et al., 2008). Nous pouvons donc supposer que les PPIs présents dans les NERs et les MV1 participeraient également aux mécanismes de fusion membranaire en facilitant l'ouverture du pore de fusion, ce qui constitue l'étape finale du processus de fusion membranaire (Figure VI-3). Des variations en concentration de PIP₂ et PIP₃ pourraient de nouveau avoir une forte influence sur les processus de fusion en jouant sur la courbure membranaire.

VI.3.4 Rôle des MV2 dans la formation de l'enveloppe nucléaire

Nous avons mentionné que les vésicules MV2 représentent 90 % des vésicules participant à la formation de l'enveloppe nucléaire et qu'elles dérivent du réticulum

endoplasmique (Collas et Poccia, 1996). Nous pouvons alors supposer que les propriétés membranaires de l'enveloppe nucléaire seraient équivalentes à celles des vésicules MV2. Nos résultats sur des modèles membranaires mimant la composition lipidique des MV2 ont révélé que ces membranes présentent un environnement dynamique intermédiaire aux membranes NERs et MV1 (Figure VI-2). Cette fluidité intermédiaire se rapproche des caractéristiques de membranes naturelles plus classiques. MV2 contribuant à 90% à l'enveloppe nucléaire formée, nous pouvons supposer qu'une fois l'enveloppe nucléaire complète, celle-ci ne contient plus les propriétés fusogènes présentes dans les MV1 ou dans les NERs (effet de dilution des MV1 dans les MV2). Ceci contribue ainsi à réguler la formation de l'enveloppe nucléaire.

VI.4 Conclusion Générale et perspectives

Ce travail démontre l'importance que peut avoir la composition lipidique des membranes dans les mécanismes cellulaires tels que la fusion membranaire. Pendant de nombreuses années, les lipides n'ont été considérés que comme un élément fondateur des membranes cellulaires, les protéines assurant le reste des missions. Cependant, nous constatons qu'en fonction de la composition lipidique des membranes, ces dernières peuvent présenter des propriétés totalement différentes pouvant faciliter un processus cellulaire plutôt qu'un autre.

Afin de s'affranchir de la complexité des membranes naturelles, nous avons travaillé sur des modèles membranaires de type liposomes. Ces modèles nous ont permis d'étudier de manière séquentielle le rôle des PPIs sur les propriétés membranaires. Nous sommes confiants sur la transposabilité de nos résultats aux membranes naturelles. En effet, préalablement à ce travail, l'étude des NERs naturels avaient révélé l'existence d'une phase liquide ordonnée (Garnier-Lhomme et al., 2009). Notre travail sur les modèles membranaires mimant la composition lipidique des NERs atteste de l'existence d'une même phase. Des études similaires sur les membranes naturelles MV1 et MV2 sont actuellement en cours.

La majorité de nos études sur les modèles membranaires a été effectuée à l'aide de la RMN des solides (^2H et ^{31}P) appliquée aux membranes. La RMN des biomembranes constitue un outil extrêmement puissant dans l'étude des propriétés membranaires puisqu'elle nous apporte des informations sur la structure des membranes ainsi que des informations locales sur la dynamique membranaire sans perturbation majeure (aussi bien au niveau des têtes polaires que des chaînes lipidiques). Nos résultats ont permis d'élaborer un modèle expliquant la manière dont les phosphoinositides présents dans les MV1 et dans les NERs peuvent

intervenir dans les mécanismes de formation de l'enveloppe nucléaire de part un rôle structural. Afin de compléter ce modèle de formation de l'enveloppe nucléaire, un certain nombre d'étude sont à envisager.

Il serait intéressant de continuer l'étude du polymorphisme des PPIs. Nous avons vu que ces lipides présentent une courbure spontanée positive. Cette propriété peut s'avérer très importante dans les mécanismes de fusion membranaire. Il apparaît par conséquent intéressant d'étudier plus en profondeur cette caractéristique des PPIs ainsi que les paramètres pouvant la moduler. L'effet structural de PIP₃ en fonction du pH est donc important à caractériser, comme nous l'avons fait pour PI, PIP et PIP₂. Les PPIs étant fortement chargés, il serait également intéressant d'étudier l'effet des ions tels que Ca²⁺ ou Mg²⁺. Cela pourrait être fait par RMN des solides et par cryo-microscopie. Enfin, il serait utile d'optimiser et d'approfondir les études par cryo-microscopie électronique afin de pouvoir effectuer une analyse statistique sur les images et comparer ces résultats de manière plus quantitative avec ceux obtenu par RMN.

Nous avons également mis en évidence des effets complexes de rigidification et de fluidification des PPIs dans les membranes, notamment dû à leur capacité à former des liaisons hydrogènes entre eux. La fluidité membranaire étant également un paramètre important dans les processus de fusion membranaire, il serait nécessaire d'approfondir ces études afin de caractériser ces effets en fonction de la concentration et du pH. De plus, il apparaît essentiel de déterminer sans ambiguïté si les phosphoinositides contenus dans les membranes MV1 et dans les NERs sont distribués de manière homogène ou sous forme de domaines. Ceci représente un défi de taille au vue de la difficulté à prouver la présence de domaines membranaires dans les membranes naturelles. Nous pourrions dans un premier temps continuer les études sur les modèles membranaires puis retourner sur les membranes naturelles. Nous pouvons envisager des mesures de T₁ (temps de relaxation longitudinale permettant l'étude des mouvements à l'échelle de la nanoseconde) pour nos différents systèmes membranaires afin de mettre en évidence (ou non) la présence de domaines à échange rapide.

Il est également envisagé de poursuivre le travail sur des modèles membranaires afin d'étudier plus en détails le rôle de DAG et le rôle de PLC γ , éléments clés dans le déclenchement des processus de fusion. Nous pourrions étudier les propriétés membranaires par RMN des solides (²H et ³¹P) de différents modèles membranaires contenant plusieurs proportions de DAG. Ceci permettrait d'estimer la quantité minimale de DAG qui déstabiliserait les vésicules MV1 et qui serait susceptible d'initier la fusion des vésicules. Il est également prévu de travailler avec des modèles membranaires mimant les MV1 traités par

PLC. La structure et la dynamique membranaire nécessaire à l'initiation de la fusion serait estimée par RMN.

Enfin pour valider l'ensemble des résultats obtenus sur les modèles membranaires, il est primordial de regarder leurs transposabilités aux membranes naturelles. Ce travail pourrait se diviser en deux parties. Dans un premier temps, nous étudierons des liposomes formés à partir des lipides extraits des membranes naturelles. Dans un deuxième temps, nous travaillerons directement avec les vésicules naturelles MV1 et MV2 extraites du cytoplasme de l'œuf fécondé. En les marquant avec POPC deutéré, il sera alors possible de les étudier par RMN du deutérium et du phosphore comme il a déjà été fait sur les NERs et les MV0 (Garnier-Lhomme et al., 2007 ; Garnier-Lhomme et al., 2009). L'effet de PLC γ sur les vésicules MV1 sera également examiné. Une comparaison de l'effet de cette enzyme sur les modèles membranaire et sur les membranes naturelles pourra alors être effectuée. De plus, il serait également intéressant de déterminer la quantité de DAG produit (et parallèlement la perte de PIP $_2$).

Références

- Abragam, A. and L. C. Hebel (1961). "The Principles of Nuclear Magnetism." *American Journal of Physics* 29(12): 860-861.
- Abramson, M. B., G. Colacicco, et al. (1968). "Ionic properties of acidic lipids. Phosphatidylinositol." *Biochemistry* 7(5): 1692-8.
- Ahyayauch, H., A. V. Villar, et al. (2005). "Modulation of PI-Specific Phospholipase C by Membrane Curvature and Molecular Order" *Biochemistry* 44(34): 11592-11600.
- Anderson, D. J. and M. W. Hetzer (2008). "Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation." *J Cell Biol* 182(5): 911-24.
- Aussenac, F., M. Laguerre, et al. (2003). "Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids Using Selectively Deuterated and Perdeuterated Labels. ²H NMR and Molecular Mechanics Study." *Langmuir* 19(25): 10468-10479.
- Aussenac, F., M. Tavares, et al. (2003). "Cholesterol Dynamics in Membranes of Raft Composition: A Molecular Point of View from ²H and ³¹P Solid-State NMR." *Biochemistry* 42(6): 1383-1390.
- Balla, T., Z. Szentpetery, et al. (2009). "Phosphoinositide Signaling: New Tools and Insights." *Physiology* 24(4): 231-244.
- Barona, T., R. D. Byrne, et al. (2005). "Diacylglycerol induces fusion of nuclear envelope membrane precursor vesicles." *J Biol Chem* 280(50): 41171-7.
- Basañez, G. (2002). "Membrane fusion: the process and its energy suppliers." *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(9): 1478-1490.
- Basanez, G., J. L. Nieva, et al. (1996). "Diacylglycerol and the promotion of lamellar-hexagonal and lamellar-isotropic phase transitions in lipids: implications for membrane fusion." *Biophys J* 70(5): 2299-2306.
- Baur, T., K. Ramadan, et al. (2007). "NSF- and SNARE-mediated membrane fusion is required for nuclear envelope formation and completion of nuclear pore complex assembly in *Xenopus laevis* egg extracts." *J Cell Sci* 120(16): 2895-2903.
- Bechinger, B. (2005). "Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: a ³¹P solid-state NMR spectroscopy study." *Biochim Biophys Acta* 1712(1): 101-8.
- Beck, J. G., D. Mathieu, et al. (2007). "Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks." *FASEB J.* 21(8): 1714-1723.
- Bloom, M., J. H. Davis, et al. (1981). "Direct determination of the oriented sample nmr spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry." *Chemical Physics Letters* 80(1): 198-202.

- Blume, A. (1993). Dynamic properties. *Phospholipids Handbook*. G. Cevc. New York, Marcel Dekker Inc.: 455-510.
- Bothorel, P. and C. Lussan (1970). "Some new aspects of a dynamic model of biological membrane." *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 271(7): 680-3.
- Bradshaw, J. P., R. J. Bushby, et al. (1999). "Orientation of the Headgroup of Phosphatidylinositol in a Model Biomembrane As Determined by Neutron Diffraction" *Biochemistry* 38(26): 8393-8401.
- Bradshaw, J. P., R. J. Bushby, et al. (1997). "The headgroup orientation of dimyristoylphosphatidylinositol-4-phosphate in mixed lipid bilayers: a neutron diffraction study." *Biochim et Biophys Acta (BBA) - Biomembranes* 1329(1): 124-138.
- Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." *J Biol Chem* 275(23): 17221-4.
- Bruggeller, P. and E. Mayer (1980). "Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions." *Nature* 288(5791): 569-571.
- Brumm, T., A. Mops, et al. (1992). "Macroscopic orientation effects in broadline NMR-spectra of model membranes at high magnetic field strength: A method preventing such effects." *Biophys J* 61(4): 1018-1024.
- Buchoux, S. (2008). *Vers un nouveau modèle de déstabilisation des membranes biologiques par les lipopeptides: Apport de la RMN à travers l'exemple de la surfactine*, Université de Bordeaux. Thèse: 262.
- Buendia, B., J. C. Courvalin, et al. (2001). "Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis." *Cell Mol Life Sci* 58(12-13): 1781-9.
- Burke, B. and J. Ellenberg (2002). "Remodelling the walls of the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(7): 487-97.
- Burke, B. and L. Gerace (1986). "A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis." *Cell* 44(4): 639-652.
- Burnett, L. J. and B. H. Muller (1971). "Deuteron Quadrupole Coupling Constants in Three Solid Deuterated Paraffin Hydrocarbons: C₂D₆, C₄D₁₀, C₆D₁₄." *The Journal of Chemical Physics* 55(12): 5829-5831.
- Byrne, R. D., T. Barona, et al. (2005). "Nuclear envelope assembly is promoted by phosphoinositide-specific phospholipase C with selective recruitment of phosphatidylinositol-enriched membranes." *Biochem J* 387(393-400).
- Byrne, R. D., M. Garnier-Lhomme, et al. (2007). "PLCgamma is enriched on poly-phosphoinositide-rich vesicles to control nuclear envelope assembly." *Cell Signal* 19(5): 913-22.

- Byrne, R. D., B. Larijani, et al. (2009c). "Tyrosine kinase regulation of nuclear envelope assembly." *Advances in Enzyme Regulation* 49(1): 148-156.
- Byrne, R. D., D. L. Poccia, et al. (2009b). "Role of phospholipase C in Nuclear Envelope Assembly." *Clin. Lipidol.* 4(1): 103-112.
- Byrne, R. D., V. Zhendre, et al. (2009a). "Nuclear envelope formation in vitro: a sea urchin egg cell-free system." *Methods Mol Biol* 464: 207-23.
- Cameron, L. A. and D. L. Poccia (1994). "In Vitro Development of the Sea Urchin Male Pronucleus." *Developmental Biology* 162(2): 568-578.
- Carrier, D. and P. T. T. Wong (1996). "Effect of dehydration and hydrostatic pressure on phosphatidylinositol bilayers: an infrared spectroscopic study." *Chemistry and Physics of Lipids* 83: 141-152.
- Cevc, G. (1991). *How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation : an effective chain-length model.* Washington, DC, ETATS-UNIS, American Chemical Society.
- Cevc, G., A. Watts, et al. (1981). "Titration of the phase transition of phosphatidylserine bilayer membranes. Effects of pH, surface electrostatics, ion binding, and head-group hydration." *Biochemistry* 20(17): 4955-4965.
- Cheever, M. L., T. K. Sato, et al. (2001). "Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes." *Nat Cell Biol* 3(7): 613-618.
- Chernomordik, L. (1996). "Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates." *Chem Phys Lipids* 81(2): 203-13.
- Chernomordik, L., M. M. Kozlov, et al. (1995). "Lipids in biological membrane fusion." *J Membr Biol* 146(1): 1-14.
- Chernomordik, L., J. Zimmerberg, et al. (2006). "Membranes of the world unite!" *J cell Biol* 175(2): 201-207.
- Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2003). "Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes." *Annu Rev Biochem* 72: 175-207.
- Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2008). "Mechanics of membrane fusion." *Nat Struct Mol Biol* 15(7): 675-83.
- Churchward, M. A., T. Rogasevskaia, et al. (2005). "Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca²⁺-triggered membrane fusion." *J Cell Sci* 118(20): 4833-4848.
- Cohen, F. S. and G. B. Melikyan (2004). "The Energetics of Membrane Fusion from Binding, through Hemifusion, Pore Formation, and Pore Enlargement." *Journal of Membrane Biology* 199(1): 1-14.

- Cohen, T. V., L. Hernandez, et al. (2008). "Functions of the nuclear envelope and lamina in development and disease." *Biochemical Society Transactions* 036(6): 1329-1334.
- Collas, P., J. C. Courvalin, et al. (1996). "Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein." *J Cell Biol* 135(6 Pt 2): 1715-1725.
- Collas, P., C. Pinto-Correia, et al. (1995c). "Lamin Dynamics during Sea Urchin Male Pronuclear Formation in Vitro." *Experimental Cell Research* 219: 687-698.
- Collas, P. and D. Poccia (1996). "Distinct egg membrane vesicles differing in binding and fusion properties contribute to sea urchin male pronuclear envelopes formed in vitro." *J Cell Sci* 109(6): 1275-1283.
- Collas, P. and D. Poccia (1995b). "Lipophilic organizing structures of sperm nuclei target membrane vesicle binding and are incorporated into the nuclear envelope." *Dev Biol* 169(1): 123-35.
- Collas, P. and D. Poccia (2000). "Membrane Fusion Events during Nuclear Envelope Formation." *Subcellular Biochemistry* 34: 273-302.
- Collas, P. and D. L. Poccia (1995a). "Formation of the sea urchin male pronucleus in vitro: Membrane-independent chromatin decondensation and nuclear envelope-dependent nuclear swelling." *Molecular Reproduction and Development* 42(1): 106-113.
- Cothren, C. C. and D. L. Poccia (1993). "Two Steps Required for Male Pronucleus Formation in the Sea Urchin Egg." *Experimental Cell Research* 205(1): 126-133.
- Crisp, M. and B. Burke (2008). "The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture." *FEBS Lett* 582(14): 2023-32.
- Cullis, P. R. and B. de Kruijff (1979). "Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes." *Biochim Biophys Acta* 559(4): 399-420.
- Cullis, P. R., D. B. Fenske, et al. (1996). Physical properties and functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of lipids, Lipoproteins and Membranes*. D. E. Vance and J. E. Vance, Elsevier Science B.V.: 1-33.
- Danielli, J. F. and H. Davson (1935). "A contribution to the theory of permeability of thin films." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5(4): 495-508.
- Davis, J. H. (1979). "Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine." *Biophysical Journal* 27(3): 339-358.
- Davis, J. H. (1983). "The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ²H-NMR." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 737(1): 117-171.

- Davis, J. H., K. R. Jeffrey, et al. (1976). "Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains." *Chemical Physics Letters* 42(2): 390-394.
- DeWolf, C., S. Leporatti, et al. (1999). "Phase separation in phosphatidylinositol/phosphatidylcholine mixed monolayers." *Chemistry and Physics of Lipids* 97(2): 129-138.
- Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." *Nature* 443(7112): 651-7.
- Diller, A., C. Loudet, et al. (2009). "Bicelles: A natural 'molecular goniometer' for structural, dynamical and topological studies of molecules in membranes." *Biochimie* 91(6): 744-51.
- Douliez, P. J, et al. (1994). Effect of vesicle size, polydispersity and multilayering on solid state $[31\text{P}]$ - and $[2\text{H}]$ -NMR spectra. Les Ulis, FRANCE, EDP Sciences.
- Douliez, J. P., A. Leonard, et al. (1996). "Conformational Order of Dmpc Sn-1 Versus Sn-2 Chains and Membrane Thickness - An Approach to Molecular Protrusion by Solid-State H-2-NMR and Neutron-Diffraction." *Journal of Physical Chemistry* 100(47): 18450-18457.
- Douliez, J. P., A. Léonard, et al. (1995). "Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings." *Biophysical Journal* 68(5): 1727-1739.
- Dubochet, J. and A. McDowell (1981). "Vitrification of pure water for electron microscopy." *Journal of Microscopy* 124.
- Dufourc, E. J. (1986). La résonance magnétique nucléaire du deutérium et du phosphore dans les milieux organisés. Théorie et applications à l'étude de l'action de la mélittinine et de la delta-lysine sur les membrane biologique. Bordeaux, Université Bordeaux 1. Thèse d'état ès Sciences: 245.
- Dufourc, E. J. (2006). Solid-state NMR in biomembranes. *Chemical Biology*. B. Larijani, C. A. Rosser and R. Woscholski, John Wiley & Sons, Ltd: 113-131.
- Dufourc, E. J. (2008). "Sterols and membrane dynamics." *J Chem Biol* 1(1-4): 63-77.
- Dufourc, E. J., C. Mayer, et al. (1992). "Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements." *Biophysical Journal* 61(1): 42-57.
- Dufourc, E. J., E. J. Parish, et al. (1984). "Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interaction as revealed by deuterium NMR." *Biochemistry* 23(25): 6062-6071.

- Dumas, F., R. D. Byrne, et al. (2010). "Spatial Regulation of Membrane Fusion Controlled by Modification of Phosphoinositides." *PLoS One* 5(8): e12208.
- Eddidin, M. (2003). "The state of lipid rafts: from model membranes to cells." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32: 257-83.
- Efrat, A., L. V. Chernomordik, et al. (2007). "Point-Like Protrusion as a Prestalk Intermediate in Membrane Fusion Pathway." *Biophysical Journal* 92(8): L61-L63.
- Eibl, H. and P. Woolley (1979). "Electrostatic interactions at charged lipid membranes. Hydrogen bonds in lipid membrane surfaces." *Biophys Chem* 10(3-4): 261-71.
- Etzkorn, M., M. Swetlana, et al. (2007). "Secondary Structure, Dynamics, and Topology of a Seven-Helix Receptor in Native Membranes, Studied by Solid-State NMR Spectroscopy13." *Angewandte Chemie International Edition* 46(3): 459-462.
- Faure, C., J. F. Tranchant, et al. (1996). "Comparative effects of cholesterol and cholesterol sulfate on hydration and ordering of dimyristoylphosphatidylcholine membranes." *Biophys J* 70(3): 1380-90.
- Fenske, D. B., J. L. Thewalt, et al. (1994). "Models of stratum corneum intercellular membranes: 2H NMR of macroscopically oriented multilayers." *Biophys J* 67(4): 1562-73.
- Fernandes, F., L. M. Loura, et al. (2006). "Absence of clustering of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in fluid phosphatidylcholine." *J Lipid Res* 47(7): 1521-5.
- Fernández, C., C. Hilty, et al. (2001). "Solution NMR studies of the integral membrane proteins OmpX and OmpA from *Escherichia coli*." *FEBS Letters Structure, Dynamics and Function of Proteins in Biological Membranes* 504(3): 173-178.
- Fischer, A. H., S. Bardarov, Jr., et al. (2004). "Molecular aspects of diagnostic nucleolar and nuclear envelope changes in prostate cancer." *J Cell Biochem* 91(1): 170-84.
- Fischer, A. H., P. Taysavang, et al. (2003). "Nuclear Envelope Irregularity Is Induced by RET/PTC During Interphase." *Am J Pathol* 163(3): 1091-1100.
- Flanagan, L. A., C. C. Cunningham, et al. (1997). "The Structure of Divalent Cation-Induced Aggregates of PIP2 and Their Alteration by Gelsolin and Tau." *Biophysical Journal* 73: 1440-1447.
- Frolov, V. A. and J. Zimmerberg (2010). "Cooperative elastic stresses, the hydrophobic effect, and lipid tilt in membrane remodeling." *FEBS Lett*.
- Gamper, N. and M. S. Shapiro (2007). "Target-specific PIP2 signalling: how might it work?" *J Physiol* 582(3): 967-975.
- Gant, T. M. and K. L. Wilson (1997). "NUCLEAR ASSEMBLY." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13(1): 669-695.

- Garidel, P., C. Johann, et al. (1997). "Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH." *Biophysical Journal* 72(5): 2196-2210.
- Garnier, M. (2007). *Characterisation of Membrane Domains in Nuclear Envelope Assembly: Composition, Structure, and Dynamics of Nuclear Envelope Remnants*. Londres, Université de Londres, Université de Bordeaux. Doctor of Philosophy: 232.
- Garnier-Lhomme, M., R. D. Byrne, et al. (2009). "Nuclear envelope remnants: fluid membranes enriched in sterols and polyphosphoinositides." *PLoS One* 4(1): e4255.
- Garnier-Lhomme, M., A. Grelard, et al. (2007). "Probing the dynamics of intact cells and nuclear envelope precursor membrane vesicles by deuterium solid state NMR spectroscopy." *Biochim Biophys Acta* 1768(10): 2516-27.
- Ge, M., K. A. Field, et al. (1999). "Electron Spin Resonance Characterization of Liquid Ordered Phase of Detergent-Resistant Membranes from RBL-2H3 Cells." *Biophysical Journal* 77(2): 925-933.
- Golebiewska, U., M. Nyako, et al. (2008). "Diffusion Coefficient of Fluorescent Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the Plasma Membrane of Cells." *Mol. Biol. Cell* 19(4): 1663-1669.
- Goñi, F. M. and A. Alonso (1999). "Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes." *Progress in Lipid Research* 38(1): 1-48.
- Gruner and M. S (1985). *Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids*. Washington, DC, ETATS-UNIS, National Academy of Sciences of the United States of America.
- Hahn, E. L. (1950). "Spin Echoes." *Physical Review* 80(4): 580.
- Hansbro, P. M., S. J. Byard, et al. (1992). "The conformational behaviour of phosphatidylinositol in model membranes: 2H-NMR studies." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1112(2): 187-196.
- Helfrich, W. (1974). "Blocked lipid exchange in bilayers and its possible influence on the shape of vesicles." *Z Naturforsch C* 29C(9-10): 510-5.
- Hendrickson, H. S. and J. G. Fullington (1965). "Stabilities of Metal Complexes of Phospholipids: Ca(II), Mg(II), and Ni(II) Complexes of Phosphatidylserine and Triphosphoinositide*." *Biochemistry* 4(8): 1599-1605.
- Hermelink, A. and G. Brezesinski (2008). "Do unsaturated phosphoinositides mix with ordered phosphatidylcholine model membranes?" *J Lipid Res* 49(9): 1918-25.

- Hirai, M., T. Takizawa, et al. (1995). "Thermotropic Phase Transition of Phosphatidylinositol 4,5-Bis(phosphate) Aggregates in Aqueous Solutions." *J. Phys. Chem.* 99: 17456-17460.
- Hirai, M., T. Takizawa, et al. (1996). "Salt-dependent phase behaviour of the phosphatidylinositol 4,5-diphosphate-water system." *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 92(9): 1493-1498.
- Hodgkin, M. N., M. R. Masson, et al. (2000). "Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain." *Current Biology* 10(1): 43-46.
- Israelachvili, J. N., S. Marcelja, et al. (1980). "Physical principles of membrane organization." *Q Rev Biophys* 13(2): 121-200.
- Jacobson, K. and C. Dietrich (1999). "Looking at lipid rafts?" *Trends Cell Biol* 9(3): 87-91.
- Jahn, R., T. Lang, et al. (2003). "Membrane Fusion." *Biophysical Journal* 112(4): 519-533.
- James, D. J., C. Khodthong, et al. (2008). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion." *J Cell Biol* 182: 355-366.
- Janmey, P. A. and P. K. Kinnunen (2006). "Biophysical properties of lipids and dynamic membranes." *Trends Cell Biol* 16(10): 538-46.
- Janmey, P. A. and U. Lindberg (2004). "Cytoskeletal regulation: rich in lipids." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8): 658-666.
- Kermaïdic, M. (2001). Travaux d'étude et de recherche (Maîtrise d'informatique): "Modélisation d'une cellule biologique à l'aide de Java et de Java 3D". Université de Bretagne Occidentale.
- Kooijman, E. E., K. E. King, et al. (2009). "Ionization Properties of Phosphatidylinositol Polyphosphates in Mixed Model Membranes." *Biochemistry* 48(40): 9360-9371.
- Koynova, R. and M. Caffrey (2002). "An index of lipid phase diagrams." *Chemistry and Physics of Lipids* 115(1-2): 107-219.
- Kozlovsky, Y. and M. M. Kozlov (2002). "Stalk Model of Membrane Fusion: Solution of Energy Crisis." *Biophysical Journal* 82(2): 882-895.
- Lang, T., N. D. Halemani, et al. (2008). "Interplay between lipids and the proteinaceous membrane fusion machinery." *Progress in Lipid Research* 47(6): 461-469.
- Larijani, B., T. Barona, et al. (2001). "Role for phosphatidylinositol in nuclear envelope formation." *Biochem J* 356(Pt 2): 495-501.
- Larijani, B. and E. J. Dufourc (2006). "Polyunsaturated phosphatidylinositol and diacylglycerol substantially modify the fluidity and polymorphism of biomembranes: a solid-state deuterium NMR study." *Lipids* 41(10): 925-32.

- Larijani, B. and D. Poccia (2007). "Protein and lipid signaling in membrane fusion: nuclear envelope assembly." *Signal Transduction* 7(2): 142-153.
- Larijani, B., D. Poccia, et al. (2000). "Phospholipid identification and quantification of membrane vesicle subfractions by ^{31}P - ^1H two-dimensional nuclear magnetic resonance." *Lipids* 35(11): 1289-1297.
- Larijani, B. and D. L. Poccia (2009). "Nuclear Envelope Formation: Mind the Gaps." *Annual Review of Biophysics* 38(1): 107-124.
- Laroche, G., E. J. Dufourc, et al. (1991). "Structure and dynamics of dimyristoylphosphatidic acid/calcium complexes by ^2H NMR, infrared, spectroscopies and small-angle x-ray diffraction." *Biochemistry* 30(12): 3105-14.
- Lau, T.-L., A. W. Partridge, et al. (2008). "Structure of the Integrin beta Transmembrane Segment in Phospholipid Bicelles and Detergent Micelles" *Biochemistry* 47(13): 4008-4016.
- Léonard, A., C. Escrive, et al. (2001). "Location of Cholesterol in DMPC Membranes. A Comparative Study by Neutron Diffraction and Molecular Mechanics Simulation" *Langmuir* 17(6): 2019-2030.
- Levental, I., A. Celis, et al. (2008a). "Combined Electrostatics and Hydrogen Bonding Determine Intermolecular Interactions Between Polyphosphoinositides." *Journal of the American Chemical Society* 130(28): 9025-9030.
- Levental, I., P. A. Janmey, et al. (2008b). "Electrostatic Contribution to the Surface Pressure of Charged Monolayers Containing Polyphosphoinositides." *Biophysical Journal* 95(3): 1199-1205.
- Li, Z., R. M. Venable, et al. (2009). "Molecular Dynamics Simulations of PIP₂ and PIP₃ in Lipid Bilayers: Determination of Ring Orientation, and the Effects of Surface Roughness on a Poisson-Boltzmann Description." *Biophysical Journal* 97(1): 155-163.
- Liepina, I., C. Czaplewski, et al. (2003). "Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." *Biopolymers* 71(1): 49-70.
- Lin, Z. (1996). "Branched Worm-like Micelles and Their Networks." *Langmuir* 12(7): 1729-1737.
- Lohka, M. J. and Y. Masui (1983). "Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components." *Science* 220(4598): 719-721.

- London, E. and D. A. Brown (2000). "Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)." *Biochim Biophys Acta* 1508(1-2): 182-95.
- Longo, F. J. and E. Anderson (1968). "The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, *Arbacia punctulata*." *J. Cell Biol.* 39(2): 339-368.
- Longo, F. J., L. Mathews, et al. (1994). "Sperm Nuclear Transformations in Cytoplasmic Extracts from Surf Clam (*Spisula solidissima*) Oocytes." *Developmental Biology* 162(1): 245-258.
- Lorin, A., C. Flore, et al. (2004). "Les liposomes: description, fabrication et applications." *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8(3): 163-176.
- Loudet, C. (2006). *Les Biphényles: un nouveau modèle de biomembrane pour l'étude de protéines membranaires par RMN des solides*. Université de Bordeaux. Thèse: 274.
- Loudet, C., A. Diller, et al. (2010). "Biphenyl phosphatidylcholine: A promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields." *Progress in Lipid Research* 49(3): 289-297.
- Lu, P. and Z. H. Zhai (2001). "Nuclear Assembly of Demembrated *Xenopus* Sperm in Plant Cell-Free Extracts from *Nicotiana* Ovules." *Experimental Cell Research* 270(1): 96-101.
- Lupyan, D., M. Mezei, et al. (2010). "A Molecular Dynamics Investigation of Lipid Bilayer Perturbation by PIP₂." *Biophysical Journal* 98(2): 240-247.
- Luttmer, S. J. and F. J. Longo (1987). "Rates of male pronuclear enlargement in sea urchin zygotes." *Journal of Experimental Zoology* 243(2): 289-298.
- Luzzati, V. (1968). *X-ray diffraction studies of lipid—water systems*. Biological Membranes. D. Chapman. New York, Academic Press: 71-123.
- Mansour, H., D.-S. Wang, et al. (2001). "Comparison of Bilayer and Monolayer Properties of Phospholipid Systems Containing Dipalmitoylphosphatidylglycerol and Dipalmitoylphosphatidylinositol." *Langmuir* 17(21): 6622-6632.
- Marsan, M. P., I. Muller, et al. (1999). "Cholesterol Orientation and Dynamics in Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers: A Solid State Deuterium NMR Analysis." *Biophysical Journal* 76(1): 351-359.
- Marsh, D. "Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers." *Chemistry and Physics of Lipids* 144(2): 146-159.
- Martin, T. F. J. (1997). "Phosphoinositides as spatial regulators of membrane traffic." *Current Opinion in Neurobiology* 7(3): 331-338.
- McIntosh, T. J. and A. D. Magid (1993). *Phospholipid Hydration*. *Phospholipids Handbook*. G. Cevc. New York, Marcel Dekker: 553-577.

- McLaughlin, S. and D. Murray (2005). "Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics." *Nature* 438(7068): 605-611.
- McLaughlin, S., J. Wang, et al. (2002). "PIP2 AND PROTEINS: Interactions, Organization, and Information Flow." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31(1): 151-175.
- McMullen, T. P. W., R. N. A. H. Lewis, et al. (2004). "Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8(6): 459-468.
- Mehring, M. (1983). *Principles of high resolution NMR in solids*. Berlin, Springer-Verlag.
- Méléard, P., C. Gerbeaud, et al. (1997). "Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content." *Biophysical Journal* 72(6): 2616-2629.
- Müller, M., O. Zschörnig, et al. (2003). "Fusion, Leakage and Surface Hydrophobicity of Vesicles Containing Phosphoinositides: Influence of Steric and Electrostatic Effects." *Journal of Membrane Biology* 192(1): 33-43.
- Newmeyer, D. D., K. L. Wilson, et al. (1991). Chapter 31 Egg Extracts for Nuclear Import and Nuclear Assembly Reactions. *Methods in Cell Biology*, Academic Press. Volume 36: 607-634.
- Ohki, S., M. Müller, et al. (2010). "Surface potential of phosphoinositide membranes: Comparison between theory and experiment." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79(1): 210-218.
- Papahadjopoulos, D., W. J. Vail, et al. (1975). "Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 394(3): 483-491.
- Park, S. H., C. Loudet, et al. (2008). "Solid-state NMR spectroscopy of a membrane protein in biphenyl phospholipid bicelles with the bilayer normal parallel to the magnetic field." *Journal of Magnetic Resonance* 193(1): 133-138.
- Parker, P. J. (2004). "The ubiquitous phosphoinositides." *Biochem Soc Trans* 32(Pt 6): 893-8.
- Parsons, T. D., J. R. Coorsen, et al. (1995). "Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells." *Neuron* 15(5): 1085-1096.
- Payrastre, B., K. Missy, et al. (2001). "Phosphoinositides : key players in cell signalling, in time and space." *Cellular Signalling* 13(6): 377-387.
- Pike, L. J. (2009). "The challenge of lipid rafts." *J Lipid Res* 50 Suppl: S323-8.
- Poccia, D. and P. Collas (1997). "Nuclear Envelope dynamics during male pronuclear development." *Developmental Growth Differ.* 39: 541-550.

- Poccia, D. and B. Larijani (2009). "Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion." *Biochem J* 418(2): 233-46.
- Pott, T., J. C. Maillet, et al. (1995). "Effects of pH and cholesterol on DMPA membranes: a solid state ^2H - and ^{31}P -NMR study." *Biophys J* 69(5): 1897-908.
- Prunuske, A. J. and K. S. Ullman (2006). "The nuclear envelope: form and reformation." *Current Opinion in Cell Biology* 18(1): 108-116.
- Raffard, G. r., S. Steinbruckner, et al. (2000). "Temperature-Composition Diagram of Dimyristoylphosphatidylcholine-Dicaproylphosphatidylcholine "Bicelles" Self-Orienting in the Magnetic Field. A Solid State ^2H and ^{31}P NMR Study." *Langmuir* 16(20): 7655-7662.
- Rajendran, L. and K. Simons (2005). "Lipid rafts and membrane dynamics." *J Cell Sci* 118(Pt 6): 1099-102.
- Rance, M. and R. A. Byrd (1983). "Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy." *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 52(2): 221-240.
- Rawicz, W., K. C. Olbrich, et al. (2000). "Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers." *Biophysical Journal* 79(1): 328-339.
- Redfern, D. A. and A. Gericke (2004). "Domain formation in phosphatidylinositol monophosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles." *Biophys J* 86(5): 2980-92.
- Redfern, D. A. and A. Gericke (2005). "pH-dependent domain formation in phosphatidylinositol polyphosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles." *J. Lipid Res.* 46(3): 504-515.
- Rizo, J., X. Chen, et al. (2006). "Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release." *Trends in Cell Biology* 16(7): 339-350.
- Rothschild, L. (1956). "The Fertilising Spermatozoon." *Discovery* 18: 64-65.
- Sanders, C. R. and K. Oxenoid (2000). "Customizing model membranes and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1508(1-2): 129-145.
- Sanders, C. R., 2nd and J. H. Prestegard (1990). "Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO." *Biophys J* 58(2): 447-60.
- Schechter, E. (1990). *Biochimie et Biophysique des Membranes : Aspects structuraux et fonctionnels*. Paris, Masson.

- Seddon, J. M. and G. Cevc (1993). Lipid Polymorphism: Structure and stability of lyotropic mesophases of Phospholipids. *Phospholipids Handbook*. G. Cevc. New York, Marcel Dekker: 403-454.
- Seelig, J. (1977). "Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes." *Quarterly Reviews of Biophysics* 10(03): 353-418.
- Seelig, J. (1978). "³¹P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes." *Biochim Biophys Acta* 515(2): 105-40.
- Seelig, J., F. Borle, et al. (1985). "Magnetic ordering of phospholipid membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 814(1): 195-198.
- Shin, K.-h., H. Maeda, et al. (1995). "Molecular miscibility of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in binary mixed bilayers with acidic phospholipids studied by ²H- and ³¹P-NMR." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1238(1): 42-48.
- Siegel, D. P. and R. M. Epand (1997). "The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms." *Biophysical Journal* 73(6): 3089-3111.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387(6633): 569-72.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(23): 720-31.
- Sodergren, E., G. M. Weinstock, et al. (2006). "The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus Purpuratus*." *Science* 314: 941-952.
- Somech, R., S. Shaklai, et al. (2005). "Nuclear envelopathies--raising the nuclear veil." *Pediatr Res* 57(5 Pt 2): 8R-15R.
- Speyer, J. B., P. K. Sripada, et al. (1987). "Magnetic orientation of sphingomyelin-lecithin bilayers." *Biophysical Journal* 51(4): 687-691.
- Stephens, S., B. Beyer, et al. (2002). "Two kinase activities are sufficient for sea urchin sperm chromatin decondensation in vitro." *Molecular Reproduction and Development* 62(4): 496-503.
- Sternin, E., M. Bloom, et al. (1983). "De-pake-ing of NMR spectra." *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 55(2): 274-282.
- Stevens, T. J. and I. T. Arkin (1999). "Are membrane proteins "inside-out" proteins?" *Proteins* 36(1): 135-43.

- Summers, S. A., B. A. Guebert, et al. (1996). "Polyphosphoinositide inclusion in artificial lipid bilayer vesicles promotes divalent cation-dependent membrane fusion." *Biophysical Journal* 71(6): 3199-3206.
- Szule, J. A., N. L. Fuller, et al. (2002). "The Effects of Acyl Chain Length and Saturation of Diacylglycerols and Phosphatidylcholines on Membrane Monolayer Curvature." *Biophysical Journal* 83(2): 977-984.
- Takizawa, T., K. Hayashi, et al. (1988). "Microcalorimetric studies of Ca²⁺ binding to triphosphoinositide and phosphatidylserine." *Thermochimica Acta* 123: 247-253.
- Takizawa, T., Y. Nakata, et al. (1998). "Differential scanning calorimetry and ¹H-NMR study of aqueous dispersions of the mixtures of dipalmitoylphosphatidylcholine and phosphatidylinositol-4,5-bis(phosphate)." *Thermochimica Acta* 308(1-2): 101-107.
- Tilcock, C. P. and P. R. Cullis (1981). "The polymorphic phase behaviour of mixed phosphatidylserine-phosphatidylethanolamine model systems as detected by ³¹P-NMR." *Biochim Biophys Acta* 641(1): 189-201.
- Toker, A. (2002). "Phosphoinositides and signal transduction." *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(5): 761-779.
- Toner, M., G. Vaio, et al. (1988). "Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." *Biochemistry* 27(19): 7435-7443.
- Traikia, M., D. E. Warschawski, et al. (2000). "Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and ³¹P-nuclear magnetic resonance." *Eur Biophys J* 29(3): 184-95.
- Van Paridon, P. A., B. de Kruijff, et al. (1986). "Polyphosphoinositides undergo charge neutralization in the physiological pH range: a ³¹P-NMR study." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 877(1): 216-219.
- Vicinanza, M., G. D'Angelo, et al. (2008). "Membrane traffic in the secretory pathway." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(18): 2833-2841.
- Villar, A. V., F. M. Goni, et al. (2001). "Diacylglycerol effects on phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and vesicle fusion." *FEBS Lett* 494: 117-120.
- Villar, A.-V., A. Alonso, et al. (2000). "Leaky Vesicle Fusion Induced by Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C: Observation of Mixing of Vesicular Inner Monolayers" *Biochemistry* 39(46): 14012-14018.
- Vinson, P. K., Y. Talmon, et al. (1989). "Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy." *Biophysical Journal* 56(4): 669-681.

- Vist, M. R. and J. H. Davis (1990). "Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry." *Biochemistry* 29(2): 451-64.
- Walter, A., P. K. Vinson, et al. (1991). "Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition." *Biophysical Journal* 60(6): 1315-1325.
- Webster, M., K. L. Witkin, et al. (2009). "Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly." *J Cell Sci* 122(10): 1477-1486.
- Wickner, W. and R. Schekman (2008). "Membrane fusion." *Nat Struct Mol Biol* 15(7): 658-64.
- Worman, H. J. and G. Bonne (2007). "'Laminopathies': a wide spectrum of human diseases." *Exp Cell Res* 313(10): 2121-33.
- Yang, L. and H. W. Huang (2002). "Observation of a Membrane Fusion Intermediate Structure." *Science* 297(5588): 1877-1879.
- Zhao, Y., X. Liu, et al. (2000). "In vitro nuclear reconstitution could be induced in a plant cell-free system." *FEBS Letters* 480(2): 208-212.
- Zhendre, V., A. Grélard, et al. (2010). "Nuclear membrane fusion: key role of polyphosphoinositides in adjusting complementary dynamics of precursor membranes." *Biophys J Submitted*.
- Zhou, C., V. Garigapati, et al. (1997). "Short-Chain Phosphatidylinositol Conformation and Its Relevance to Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C α ." *Biochemistry* 36(50): 15925-15931.
- Zimmerberg, J., S. A. Akimov, et al. (2006a). "Synaptotagmin: fusogenic role for calcium sensor?" *Nat Struct Mol Biol* 13(4): 301-303.
- Zimmerberg, J. and M. M. Kozlov (2006b). "How proteins produce cellular membrane curvature." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1): 9-19.
- Zimmerberg, J., S. S. Vogel, et al. (1993). "Mechanisms of Membrane Fusion." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 22(1): 433-466.
- Zink, D., A. H. Fischer, et al. (2004). "Nuclear structure in cancer cells." *Nat Rev Cancer* 4(9): 677-87.

Résumé

Des pathologies telles que la myopathie et certains types de cancer, peuvent être causées par une mauvaise formation de l'enveloppe nucléaire (EN), processus se produisant lors de chaque division cellulaire mais aussi lors de la formation du pronoyau mâle. Un modèle *in vitro*, dérivé de gamètes d'oursins, a été utilisé afin d'étudier les différentes étapes de formation de l'EN et a permis de révéler plusieurs informations essentielles. Un des points critiques est que des membranes fortement enrichies en phosphoinositides polyphosphorylés (PPIs) sont essentielles à la formation de l'EN, notamment lors des étapes de fusion membranaire. Ces membranes proviennent du cytoplasme de l'ovocyte fécondé (MV1) et des noyaux de spermatozoïdes (NERs). Nous avons construit des modèles membranaires mimant les compositions lipidiques de ces membranes, puis étudié leur structure, leur dynamique ainsi que leur morphologie par spectroscopie de RMN des solides et microscopie électronique. Nous avons montré que les PPIs induisent une courbure membranaire positive, conduisant à la formation de petites vésicules ou de micelles allongées. Plus important encore, dans le modèle « MV1 », les membranes sont très fluides. Le modèle « NERs » est constitué de membranes globalement ordonnées, semblables aux phases dites « liquides ordonnées » avec une modulation apportée par la PPIs. Nous avons également construit un modèle membranaire mimant la composition lipidique des vésicules MV2, membranes non-enrichies en PPIs mais représentant 90 % des vésicules participant à la formation de l'EN. Ce modèle membranaire présente une dynamique intermédiaire à celle observée pour les modèles MV1 et NERs. Ces propriétés nouvelles ont permis de proposer un mécanisme décrivant le rôle des PPIs lors de la fusion membranaire conduisant à la formation de l'enveloppe nucléaire.

Mots-clés : enveloppe nucléaire (EN), phosphoinositides, fusion membranaire, modèles membranaires, structure et dynamique membranaire, RMN des solides (^2H et ^{31}P).

Abstract

Diseases, such as myopathies and some types of cancer, can be caused by abnormal nuclear envelope (NE) assembly, a process that takes place at each cell division and during male pronuclear formation. A cell-free assay from sea urchin gametes, that mimics the *in vivo* male pronucleus formation, has been used to dissect the various stages of NE assembly. This *in vitro* assay has revealed several novel features. One of the critical aspects is that membranes highly enriched in polyphosphorylated phosphoinositides (PPIs), are essential for NE formation, especially during the stage of membrane fusion. These membranes are extracted from the cytoplasm of the fertilised oocyte (MV1) and sperm nuclei (NERs). We made model membranes with similar lipid composition to MV1 and NERs and studied their structure, dynamics and morphologies by solid-state NMR spectroscopy and electron microscopy. We show that PPIs have a positive membrane curvature, inducing small vesicles and elongated micelles. More importantly, we illustrate that “MV1-like” membranes are very fluid. “NERs-like” membranes are globally ordered and belong to the family of liquid ordered phases. We also evidenced that PPIs can counterbalance in part the ordering effect of cholesterol. Moreover we made model membranes with similar lipid composition to MV2, non-enriched in PPIs membranes which constitute 90% of the vesicles forming the NE. This model membrane shows an in-between dynamics compared to MV1 and NERs. We therefore propose a mechanism describing the role of PPIs during membrane fusion leading to nuclear membrane assembly.

Key words: nuclear envelope, phosphoinositides, membrane fusion, model membranes, membrane structure and dynamics, solid-state NMR (^2H et ^{31}P).