

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU GRADE DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (BIOPHYSIQUE)

PAR
PIERRE LAVIGNE
B. SC. (BIOCHIMIE)

UNE NOUVELLE APPROCHE POUR MESURER LA CONTRIBUTION
DES RÉSIDUS HYDROPHOBES À LA STABILISATION DE LA
STRUCTURE TERTIAIRE DES PROTÉINES GLOBULAIRES

JUIN 1994

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

Résumé: *

Nous présentons une approche pour quantifier la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des protéines globulaires par la liaison hydrophobe. Notre approche est basée sur l'évaluation de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) de bicouches d'homopolypeptides hydrophobes (chaînes polypeptidiques constituées par la répétition d'un même résidu hydrophobe) formées à partir de leurs films monomoléculaires à l'interface air-eau. Nous exploitons ainsi le fait que les isothermes de pression de surface (Π) - aire résiduelle (A) de ce type de molécules montrent généralement une transition de phase correspondant à la transition d'une organisation monomoléculaire (monocouche) vers une organisation bimoléculaire (bicouche).

Dans cette approche, l'énergie libre de stabilisation des bicouches et la contribution des résidus hydrophobes à cette stabilisation sont évaluées à partir de boucles d'hystérèse observées sur les isothermes Π - A lorsque les films d'homopolypeptides hydrophobes sont soumis à des cycles de compression et d'expansion durant leurs transitions monocouche-bicouche. Nous montrons en fait que l'énergie libre de stabilisation est donnée par l'intégration de la surface délimitée par ces boucles d'hystérèse.

Nous avons ainsi mesuré le ΔG_{stab} attribuable au transfert de résidus Alanine de la surface aqueuse vers une bicouche de Poly-L-Alanine (PLA) organisée majoritairement en hélice- α . Nous avons aussi mesuré le ΔG_{stab} attribuable au transfert de résidus Leucine de la surface aqueuse vers une bicouche de Poly-L-Leucine (PLL) organisée majoritairement en feuillet- β antiparallèle. Les valeurs que nous avons mesurées pour les résidus Alanine et Leucine sont comparées avec les valeurs correspondantes de ΔG_{tr} de Nozaki et Tanford et de Fauchère et Pliska et d'une autre échelle établie à partir de coefficients de partition empiriques des résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur des protéines globulaires. À partir de cette comparaison, nous discutons de la pertinence de notre approche.

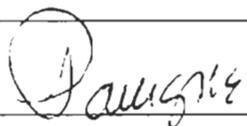
Contrairement à l'idée préconçue d'une transition monocouche-bicouche en une seule étape pour des films d'homopolypeptides hydrophobes organisés majoritairement en hélice- α ou majoritairement en feuillet- β , nous proposons que les transitions monocouche-bicouche de la PLA (organisée majoritairement en hélice- α) et

de la PLL (organisée majoritairement en feuillet- β antiparallèle) se déroulent plutôt en deux étapes successives et graduelles. En effet, nous mettons en évidence une transition de phase d'ordre second supplémentaire précédant celle normalement attribuée à la transition monocouche-bicouche sur les isothermes Π -A de films d'homopolypeptides hydrophobes organisés majoritairement en hélice- α ou majoritairement en feuillet- β . À l'aide d'un modèle que nous présentons pour calculer l'aire résiduelle pour des hélices- α et des paramètres structuraux concernant le feuillet- β , nous attribuons aux débuts de ces transitions de phases inédites le début des transitions monocouche-bicouche. Nous discutons ainsi d'un mécanisme en deux étapes pour la transition monocouche-bicouche de la PLA et de la PLL.

L'analyse des isothermes de potentiel de surface (ΔV) - aire résiduelle (A) obtenues pour la PLA et la PLL vient supporter la localisation sur les isothermes Π -A des endroits où débutent les transitions monocouche-bicouche ainsi que le mécanisme de transition que nous proposons.

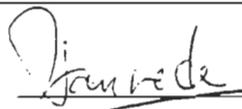
L'étude de la conformation des homopolypeptides a été effectuée par l'analyse des spectres Infra-Rouge par Transformée de Fourier (FTIR) par Réflectances Internes Multiples (MIR) de leurs films Langmuir-Blodgett construits en différents endroits sur les isothermes Π -A.

Afin d'éprouver notre méthodologie (modélisation, isothermes Π -A, ΔV -A et FTIR-MIR) nous avons étudié le comportement interfacial et la conformation (α -hélicoïdale) à l'interface air-eau d'un homopolypeptide hydrophobe bien caractérisé dans la littérature: le Poly- γ -Benzyl-L-Glutamate (PBLG). Nous précisons en plus certains aspects de son organisation et de son isotherme ΔV -A.



Signature du candidat

Date: Le 21 juin 1994



Signature du directeur de recherche

Date: Le 27 juin 1994

Signature du co-auteur (s'il y a lieu)

Date:

Signature du co-directeur (s'il y a lieu)

Date:

À Nicole et Norman

À Pascale

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier mon directeur, le Professeur Pierre Tancrède du département de Chimie-Biologie, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Sa rigueur, ses connaissances et sa compétence m'ont permis de cheminer dans un environnement fécond. Son amitié, son honnêteté et sa générosité m'ont beaucoup touchées. Je garde de lui le souvenir d'un excellent directeur de recherche. Merci Pierre.

Mon intérêt pour la biophysique s'est développé auprès de mon co-directeur et ami, le Dr. François Lamarche du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments (C.R.D.A.) de Saint-Hyacinthe, à l'époque où il était lui-même étudiant au doctorat en biophysique à l'U.Q.T.R.. Il fut à ce moment, de même que pour la durée de mes études graduées, une source d'inspirations et de connaissances déterminantes. C'est aussi auprès de lui, au C.R.D.A., et sous sa bienveillance, qu'une partie de mon travail expérimental s'est déroulée. Je m'incline devant son courage. Merci François Tapatouk!

Je m'en voudrais de ne pas signaler l'implication du Dr. Jean-Joseph Max dans mon cheminement de chercheur-étudiant. Il m'a beaucoup appris. Je te remercie Jean-Joseph.

J'en profite aussi pour remercier M. Denis Ippersiel et Mmes Lucie Landry, Nathalie Chabot et Diane Montpetit que j'ai eu la chance de côtoyer et qui m'ont rendu de précieux services durant mes séjours au CRDA. Je suis aussi reconnaissant à la direction de cet établissement de m'avoir permis d'utiliser espaces et équipements.

J'aimerais aussi remercier le Professeur Camille Chapados du département de Chimie-Biologie pour ses judicieux conseils en spectroscopie infra-rouge et pour tous les bons moments passés en sa compagnie.

Je remercie le Professeur Christian Salesse du Centre de Recherche en Photobiophysique de l'U.Q.T.R., chez qui nous avons effectué des mesures en microscopie d'épifluorescence, et un de ses étudiants gradués au doctorat, M. Michel Grandbois. Leur collaboration et leur expertise furent grandement appréciées.

Les études graduées représentent une occasion de se faire des amis parmi les collègues étudiants. Parmi les étudiants (certains sont maintenant gradués) dont j'ai eu le plaisir de côtoyer et qui m'ont rendu de précieux services, il y a: Michel Grandbois, Benoit Pigeon, Jean Désilets, Thierry Lebihan, Normand Denicourt, Marc Brullemans, Michel Déry, Normand Beaudoin, Samir Elouatik, Serge Gauvin, Gaëtan L'heureux, André Desormeaux, Robert Grimard et Serge Picard. Merci les gars!

RESUME

Nous présentons une approche pour quantifier la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des protéines globulaires par l'interaction hydrophobe. Notre approche est basée sur l'évaluation de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) de bicouches d'homopolypeptides hydrophobes (chaînes polypeptidiques constituées par la répétition d'un même résidu hydrophobe) formées à partir de leurs films monomoléculaires à l'interface air-eau. Nous exploitons ainsi le fait que les isothermes de pression de surface (Π) - aire résiduelle (A) de ce type de molécule montrent généralement une transition de phase correspondant à la transition d'une organisation monomoléculaire (monocouche) vers une organisation bimoléculaire (bicouche).

Dans cette approche, l'énergie libre de stabilisation des bicouches et la contribution des résidus hydrophobes à cette stabilisation sont évaluées à partir de boucles d'hystérèse observées sur les isothermes Π - A lorsque les films d'homopolypeptides hydrophobes sont soumis à des cycles de compression et d'expansion durant leur transition monocouche-bicouche. Nous montrons en fait que l'énergie libre de stabilisation est donnée par l'intégration de la surface délimitée par ces boucles d'hystérèse.

Nous avons ainsi mesuré le ΔG_{stab} attribuable au transfert de résidus Alanine de la surface aqueuse vers une bicouche de Poly-L-Alanine (PLA) organisée majoritairement en hélice- α . Nous avons aussi mesuré le ΔG_{stab} attribuable au transfert de résidus Leucine de la surface aqueuse vers une bicouche de Poly-L-Leucine (PLL) organisée majoritairement en feuillet- β antiparallèle. Les valeurs que nous avons mesurées pour les résidus Alanine et Leucine sont comparées avec les valeurs correspondantes de ΔG_{tr} de Nozaki et Tanford et de Fauchère et Pliska et aux valeurs d'une autre échelle établie à partir de coefficients de partition empiriques des résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur des protéines globulaires. À partir de cette comparaison, nous discutons de la pertinence de notre approche.

Contrairement à l'idée établie d'une transition monocouche-bicouche en une seule étape pour des films d'homopolypeptides hydrophobes organisés soit majoritairement en hélice- α ou soit majoritairement en feuillet- β , nous proposons que les transitions monocouche-bicouche de la PLA (organisée majoritairement en hélice- α) et de la PLL (organisée majoritairement en feuillet- β antiparallèle) se déroulent plutôt en deux étapes successives et graduelles. En effet, nous mettons en évidence une transition de phase d'ordre second supplémentaire précédant celle normalement attribuée à la transition monocouche-bicouche sur les isothermes Π -A de films d'homopolypeptides hydrophobes organisés majoritairement en hélice- α ou majoritairement en feuillet- β . À l'aide d'un

modèle que nous présentons pour calculer l'aire résiduelle pour des hélices- α et des paramètres structuraux concernant le feuillet- β , nous attribuons aux débuts de ces transitions de phases inédites le début des transitions monocouche-bicouche. Nous discutons ainsi d'un mécanisme en deux étapes pour la transition monocouche-bicouche de la PLA et de la PLL.

L'analyse des isothermes de potentiel de surface (ΔV) - aire résiduelle (A) obtenues pour la PLA et la PLL vient supporter la localisation sur les isothermes Π -A des endroits où débutent les transitions monocouche-bicouche ainsi que le mécanisme de transition que nous proposons.

La détermination de la conformation des homopolypeptides a été effectuée par l'analyse des spectres infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) obtenus en utilisant des lamelles de réflectances internes multiples (MIR) sur lesquelles des films Langmuir-Blodgett ont été déposés à différents endroits sur les isothermes Π -A.

Afin d'éprouver notre méthodologie (modélisation, isothermes Π -A, ΔV -A et FTIR-MIR) nous avons étudié le comportement interfacial et la conformation (α -hélicoïdale) à l'interface air-eau d'un homopolypeptide hydrophobe bien caractérisé dans la littérature: le Poly- γ -Benzyl-L-Glutamate (PBLG). Nous précisons en plus certains aspects de son organisation et de son isotherme ΔV -A.

TABLE DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENTS	ii
RESUME.....	iv
TABLE DES MATIERES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 Eléments relatifs à la structure secondaire et à la structure tertiaire des protéines.....	2
1.1.1 Structures secondaires	2
1.1.1.1 L'hélice- α	5
1.1.1.2 Feuillet- β antiparallèle et parallèle	6
1.1.1.3 Les boucles- β	9
1.1.2 Eléments de structures tertiaires.....	10
1.1.2.1 Les entassements hélice- α -hélice- α	10
1.1.2.2 Les entassements de feuillet- β	13
1.2. La stabilité des protéines globulaires	14
1.2.1 Généralités sur la stabilité des protéines globulaires.....	14
1.2.2 Généralités sur l'organisation des protéines globulaires.....	16
1.2.3 Nature des atomes formant l'intérieur et la surface des protéines globulaires.	17
1.2.3.1 L'intérieur d'une protéine vu comme un solide.....	22

1.2.4 Vue globale de la stabilité des protéines globulaires.....	23
1.2.4.1 Contributions des atomes polaires.....	25
1.2.4.2 La perte d'entropie conformationnelle.....	27
1.2.4.3 L'interaction hydrophobe.....	28
1.3 Objet du présent travail: proposition d'une nouvelle approche pour mesurer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation de la structure tertiaire des protéines globulaires	33
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES.....	37
2.1 Pureté des produits.....	37
2.2 Méthodes.....	39
2.2.1 La cuve de Langmuir.....	39
2.2.1.1 La pression de surface, Π	41
2.2.1.2. Mesure de la pression de surface.....	42
2.2.2 La formation des films monomoléculaires.....	44
2.2.3 Le potentiel de surface, ΔV	45
2.2.3.1 Les origines du potentiel de surface: que mesure-t-on ?.....	45
2.2.3.2 La mesure du potentiel de surface, ΔV	46
2.2.3.3 Interprétation des valeurs de ΔV mesurées.....	48
2.2.4 Analyse conformationnelle de polypeptides par infrarouge.....	52
2.2.4.1 Fabrication des films Langmuir-Blodgett.....	57
2.2.4.2 Enregistrement des spectres infrarouge.....	57
2.2.5 Visualisation des agrégats de PBLG aux grandes aires résiduelles par microscopie à épifluorescence directement à l'interface air-eau.....	58

CHAPITRE 3: L'ORGANISATION DU POLY- γ -BENZYL-L-GLUTAMATE A L'INTERFACE AIR-EAU SOUS SA CONFORMATION α -HELICOÏDALE.....	61
3.1 L'isotherme Π -A du PBLG et l'étude de sa conformation à l'interface air-eau par FTIR-MIR.....	66
3.1.1 L'isotherme Π -A du PBLG	66
3.1.2 Mesures en infrarouge	68
3.2 Organisation du PBLG au début de la transition monocouche-bicouche	70
3.2.1 Présentation du modèle utilisé pour calculer la distance entre les axes des hélices- α et l'aire résiduelle correspondante	71
3.2.2 Calcul de la distance entre les hélices- α de PBLG et des aires résiduelles correspondantes pour différentes conformations des chaînes latérales	76
3.2.2.1 Conformation étendue.....	76
3.2.2.2 Conformation repliée.....	80
3.2.3 Comparaison entre les différents modèles d'organisation des hélices- α de PBLG au début de la transition monocouche-bicouche	84
3.3 Organisation et comportement du PBLG aux grandes aires résiduelles	90
3.3.1 L'isotherme de potentiel de surface ΔV -A du PBLG.....	91
3.3.2 Mesures en microscopie à épifluorescence à l'interface air-eau et analyse des valeurs de μ_{\perp} du PBLG aux valeurs d'aires résiduelles supérieures à celle du début de la transition	97
3.4 Conclusion.....	105
CHAPITRE 4: LES PROPRIETES INTERFACIALES DE LA PLA ET DE LA PLL.....	107

4.1. Isothermes de pression de surface (Π) - aire résiduelle (A) de la PLA et de la PLL.....	109
4.2 Conformation de la PLA et de la PLL à l'interface air-eau.....	117
4.2.1 Estimation de la proportion des conformations présentes par simulation spectrale de la bande Amide I originale.....	122
4.3 Modélisation de l'organisation de la PLA et la PLL à l'interface.....	129
4.3.1 L'organisation de la PLA.....	129
4.3.2 L'organisation de la PLL.....	139
4.4 Les isothermes de potentiel de surface (ΔV) - aire résiduelle (A) de la PLA et de la PLL.....	146
4.5 Conclusion.....	159
CHAPITRE 5: PROPOSITION D'UNE APPROCHE POUR MESURER LA CONTRIBUTION DES RESIDUS HYDROPHOBES A LA STABILISATION DE LA STRUCTURE TERTIAIRE DES PROTEINES GLOBULAIRES A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DES MONOCOUCHEs.....	161
5.1 Les isothermes Π -A de compression-expansion de la PLA et de la PLL.....	164
5.2 Thermodynamique de la stabilisation des bicouches de PLA et PLL.....	166
5.3 Extraction de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) attribuable au transfert de résidus Alanine et Leucine de la surface aqueuse vers les bicouches.....	178
5.4 Comparaison entre les valeurs de ΔG_{stab} effectifs mesurés pour les résidus Alanine et Leucine et celles de ΔG_{tr} des chaînes latérales de Nozaki-Tanford et Fauchère-Pliska ainsi que les valeurs de ΔG_{tr} empiriques de Miller et collaborateurs.....	182
5.5 Conclusion.....	194
CHAPITRE 6: CONCLUSION GENERALE.....	197

BIBLIOGRAPHIE.....207
ANNEXE A.....223

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau	
1. Valeurs des angles de torsion ψ et ϕ du squelette polypeptidique pour les différentes structures secondaires.....	4
2. Quelques valeurs de ΔG_{tr} pour des chaînes latérales hydrophobes telles que déterminées par Fauchère et Pliska (F.-P.) et Nozaki et Tanford (N.-T.).	31
3. Position de la bande Amide I des polypeptides sur un spectre infrarouge en fonction de la structure secondaire.....	54
4. Distances (en Å) séparant les différents atomes du squelette polypeptidique de l'axe d'une hélice- α (d_i), valeurs des rayons de van der Waals (r_{vdW}) de ces atomes et distances effectives (d_{eff}) correspondantes.....	72
5. Position (ν), intensité (I), intensité intégrée (A), pleine largeur à mi-hauteur (τ) et forme des deux composantes de la bande Amide I du spectre infrarouge de la PLA obtenus par simulation spectrale.....	125
6. Position (ν), intensité (I), intensité intégrée (A), pleine largeur à mi-hauteur (τ) et forme des composantes de la bande Amide I du spectre infrarouge de la PLL obtenus par simulation spectrale.	127
7. Comparaison entre les valeurs de ΔG_{stab} effectifs (en kcal/mol) estimées dans ce travail et les valeurs correspondantes de ΔG_{tr} évaluées par d'autres auteurs.....	182

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure	
1. Représentation des angles de torsion du squelette polypeptidique et des chaînes latérales. Tiré de Schulz et Schirmer (1979).....	3
2. Schéma d'une hélice- α classique.....	6
3. a-représentation schématique d'un feuillet- β antiparallèle en perspective. Les C^α sont représentés par les points et la direction de la liaison $C^\alpha-C^\beta$ par les courtes barres. b et c-représentations de vues du dessus d'un feuillet- β antiparallèle et d'un feuillet- β parallèle. Tiré de Schulz et Schirmer (1979).....	7
4. Structures des boucles- β les plus communes. Tiré de Creighton, T. E. (1993).....	9
5. Représentation schématique d'une hélice- α de poly-L-alanine. Tirée de Chothia <i>et al.</i> (1981).....	12
6. Analyse des surfaces accessible et inaccessible d'une protéine globulaire. Schéma d'une section d'une tranche d'une protéine globulaire. Tiré de Creighton, T. E. (1993).	18
7. Représentation schématique de la cuve de Langmuir utilisée pour mesurer les isothermes Π -A et ΔV -A.	40
8. Représentation schématique d'un dispositif à miroirs utilisé pour l'échantillonnage d'un spectre FTIT-MIR. Tiré de Harrick, N. J. (1967).....	56

9. Schéma d'une cuve de Langmuir sur laquelle est monté un microscope à épifluorescence. Tiré et adapté de Grainger *et al.* (1989). 59
10. Isotherme de pression de surface (Π)-aire résiduelle (A) obtenue pour le PBLG étalé à l'interface air-eau bidistillée en utilisant le chloroforme comme solvant d'étalement. $T=20. \pm 2^\circ\text{C}$. Degré de polymérisation =105. 67
11. Région des bandes Amides I et II du spectre FTIR-MIR d'une monocouche Langmuir-Blodgett de PBLG transférée sur un cristal de Ge au début de la transition monocouche-bicouche ($\Pi = 8 \text{ mN/m}$). 69
12. a- Représentation schématique d'une coupe transversale de trois hélices- α en contact via les chaînes latérales (organisation côte à côte) représentées par les zones ombrées. b- Représentation schématique d'une coupe transversale de quatre hélices- α interdigitées. 73
13. Représentation schématique des coordonnées cartésiennes du C^α et C^β d'un résidu Alanine dans une hélice- α 74
14. Conformation étendue d'une chaîne latérale d'un résidu benzyle glutamate dans une hélice- α 77
15. Conformation d'une chaîne latérale d'un résidu benzyle glutamate dans une hélice- α avec les valeurs d'angles de torsion suivantes: $\chi^{1, 2} = 180^\circ$, $\chi^3 = 0^\circ$, $\chi^4 = -90^\circ$ et $\chi^{5, 6} = 180^\circ$ 81
16. a- Vue dans le sens du grand axe d'une hélice- α de PBLG de 18 résidus de long avec une conformation des chaînes latérales telle que décrite à la Fig.15. b- Vue de côté. 82
17. Vue de côté d'une hélice- α de PBLG de 18 résidus de long avec une conformation toute étendue des chaînes latérales. 86

18. Représentation schématique des interactions inter-hélices entre molécules de poly-p-Cl-benzyl-L-aspartate. Tirée de Scheraga, H. A. (1981).	87
19. Arrangement entre deux molécules de benzène correspondant à une géométrie enthalpiquement favorable. Tiré de Burley et Petsko (1988).	89
20. Isotherme de potentiel de surface (ΔV) - aire résiduelle (A) obtenue pour le PBLG étalé à l'interface air-eau bidistillée en utilisant le chloroforme comme solvant d'étalement. $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$. Degré de polymérisation = 105.	92
21. Micrographie d'un film de PBLG prise à $30 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Grossissement: 400 X. Concentration de Rhodamine B dans la sous-phase: 100 nM. La barre vaut $50 \mu\text{m}$	99
22. Micrographies d'un film de PBLG prises à A: $26,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et B: $20,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Grossissements: 200X. Concentration de Rhodamine B dans la sous-phase: 100 nM. Les barres valent $100 \mu\text{m}$	101
23. Graphique du moment dipolaire μ_{\perp} , calculé à partir de la relation 2.9 et des valeurs de ΔV présentées sur l'isotherme ΔV -A du PBLG (Fig.20) en fonction de A.	103
24. Isothermes Π -A obtenues pour la PLA (D.P. 265) et la PLL (D.P. 92).	111
25. Graphique du module de compressibilité (κ) des films PLA et de PLL en fonction de A.	113
26. Région des bandes Amide I et II des spectres FTIR-MIR enregistrés pour des films Langmuir-Blodgett de PLA et de PLL.	119
27. Simulation spectrale de la région de la bande Amide I du spectre FTIR-MIR de la PLA présenté à la Fig. 26.	124

28. Simulation spectrale de la région de la bande Amide I du spectre FTIR-MIR de la PLL présenté à la Fig. 26.....	126
29. a- Représentation schématique de l'organisation du film de PLA au début de la transition monocouche-bicouche (12,5 Å ² /résidu). b- Organisation schématique de l'état intermédiaire dont nous proposons l'existence vers 10,5 Å ² /résidu. c- Organisation schématique de la bicouche (6,5 Å ² /résidu).	135
30. Représentation schématique d'un résidu Leucine dans une hélice- α avec une conformation étendue de la chaîne latérale ($\chi^1 = \chi^2 = \chi^3 = 180^\circ$).	141
31. a- Représentation schématique de l'organisation du film de PLL au début de la transition monocouche-bicouche (16,0 Å ² /résidu). b- Organisation schématique de l'état intermédiaire dont nous proposons l'existence vers 14,0 Å ² /résidu. c- Organisation schématique de la bicouche.	144
32. Isothermes ΔV -A obtenues pour la PLA et la PLL.	149
33. Graphiques du moment dipolaire perpendiculaire (μ_{\perp}) de la PLA et de la PLL en fonction de l'aire résiduelle (A).	152
34. Simulation de la croissance hyperbolique de ΔV des isothermes ΔV -A de la PLA et de la PLL avant l'obtention des pseudo-plateaux sur les isothermes ΔV -A.....	153
35. Représentation schématique d'un film de PLA organisé essentiellement en hélices- α avec une valeur d'angle θ de 45°.	156
36. Exemples d'isothermes Π -A de compression-expansion obtenues pour la PLA lorsque les expansions furent opérées à partir de différentes valeurs d'aires résiduelles comprises entre le début et la fin de la transition monocouche-bicouche.....	164

37. Exemples d'isothermes Π -A de compression-expansion obtenues pour la PLL lorsque les expansions furent opérées à partir de différentes valeurs d'aires résiduelles plus petites que le début de la transition monocouche-bicouche.....	165
38. a- Représentation graphique du travail de compression pour amener un film de PLA d'une pression de surface initiale nulle jusqu'à une pression de surface finale d'environ 30 mN/m. b- Représentation graphique du travail d'expansion fourni par un film de PLA en passant d'une pression de surface initiale d'environ 30 mN/m jusqu'à une pression de surface finale nulle. c- Représentation graphique de l'énergie libre emmagasinée sous forme d'énergie libre de stabilisation durant le cycle compression-expansion présenté en a et b. d- Boucle d'hystérèse obtenue lorsque l'expansion fut opérée au début de la transition et montrant la stabilisation apparente de l'état monomoléculaire de la PLA. e- Représentation graphique de l'énergie libre de stabilisation apparente de la bicouche de PLA attribuable au transfert de résidus de l'interface vers la bicouche.....	170
39. Graphique de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) emmagasinée dans les films de PLA en fonction du degré d'avancement de la formation de la bicouche (B_f).	175
40. Graphique de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) emmagasinée dans les films de PLL en fonction du degré d'avancement de la formation de la bicouche (B_f).	176
41. Représentation schématique des différents effets pouvant mener à une différence entre les valeurs de ΔG_{tr} de Nozaki-Tanford et Fauchère-Pliska et les valeurs de ΔG_{stab} effectifs mesurées selon notre approche.....	189
42. Modèles d'organisations de super-hélices à deux brins à l'interface air-eau.....	224

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Un des défis actuels de la biophysique moléculaire est l'élucidation du code stéréochimique qui est caché dans la structure primaire des protéines. Ce code est responsable de l'unicité de la structure tridimensionnelle que les protéines adoptent dans leur milieu natif. Il s'agit en quelque sorte de la recherche de la seconde moitié du code génétique. Ce défi est reconnu sous le nom du problème du repliement des protéines (protein folding problem) (Creighton, T. E. (1993)). D'autre part, l'étude des mécanismes et des forces responsables de la stabilisation de la structure des protéines globulaires s'avère une étape essentielle dans la recherche du code stéréochimique responsable de leur repliement. On l'aura compris par ce qui précède, le présent travail se veut une contribution à l'étude des phénomènes physiques régissant la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires. Avant d'aborder les considérations énergétiques concernant la stabilisation des protéines, ce chapitre débutera par un rappel succinct concernant leurs structures secondaires et tertiaires.

1.1 Eléments relatifs à la structure secondaire et à la structure tertiaire des protéines

1.1.1 Structures secondaires

L'organisation régulière du squelette polypeptidique des structures secondaires est décrite par des valeurs caractéristiques de deux angles de torsion par résidu *e.g.* $N_iH-C_iHR-C_iO$ où R représente la chaîne latérale. Ces angles de torsions sont dénotés ψ et ϕ (Fig. 1). Pour un résidu i , ϕ_i décrit l'angle dièdre formé par la projection de Newman des liaisons $C_{i-1}-N_i$ et $C_i^\alpha-C_i$ autour de la liaison $N_i-C_i^\alpha$. L'angle de torsion ψ^i décrit quant à lui l'angle formé par la projection de Newman des liaisons $N_i-C_i^\alpha$ et C_i-N_{i+1} autour de la liaison $C_i^\alpha-C_i$. Les valeurs que prennent ψ et ϕ sont déterminées par la valeur, en degrés, de la rotation nécessaire autour de la liaison centrale pour amener dans une conformation éclipsée les deux liaisons définissant l'angle de torsion. Les valeurs d'angles de torsion sont toujours comprises entre $+180^\circ$ et -180° . Les angles de torsion possèdent une valeur positive, si pour éclipser les liaisons, une rotation vers la droite est nécessaire. Des valeurs négatives sont obtenues si cette rotation s'effectue vers la gauche. Seule la plus petite valeur absolue d'une rotation (et son signe) est retenue pour décrire les angles de torsion. Sur la Fig. 1, le squelette polypeptidique est dans une conformation étendue et les angles de torsion ψ et ϕ valent tous les deux $+180^\circ$. Le signe positif a préséance sur le signe négatif.

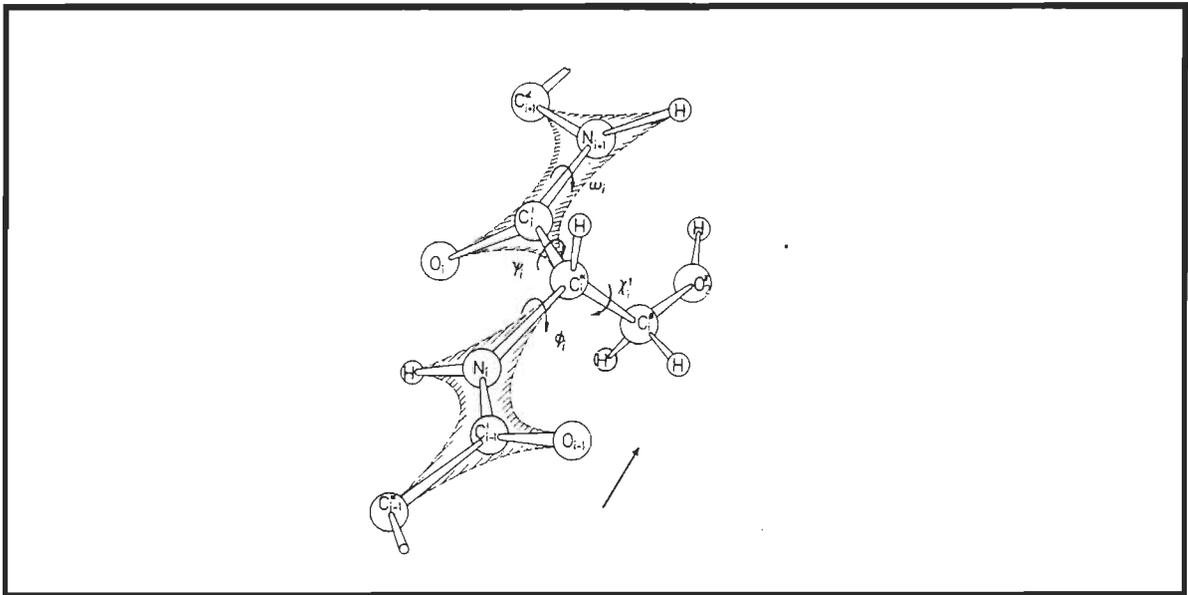


Figure 1. Définition des angles de torsion du squelette polypeptidique et des chaînes latérales (tiré de Schulz et Schirmer (1979)). Les détails sont présentés dans le texte. La description que nous faisons des différents angles de torsion est tirée de l'ouvrage de la commission de la IUPAC-IUB sur la nomenclature biochimique (IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature (1970)).

L'angle de torsion ω (formé par la projection de Newman des liaisons $C_i^{\alpha}-C_i$ et $N_{i+1}-C_{i+1}$ autour de la liaison C_i-N_{i+1}) décrit la conformation de la liaison peptidique (NH-CO). Etant donné la nature de double liaison partielle de cette liaison, ω ne peut prendre que deux valeurs: 0° pour une conformation *cis* et 180° pour conformation *trans*. Pour l'hélice- α et les feuillets- β , ω vaut toujours approximativement 180° . Nous résumons au Tableau 1 les valeurs de ψ et ϕ pour l'hélice- α et les feuillets- β parallèle et antiparallèle.

Taleau 1
Valeurs des angles de torsion ψ et ϕ du squelette polypeptidique
pour différentes structures secondaires¹.

Structure secondaire	ϕ (degré)	ψ (degré)
Hélice- α	-57	-47
Feuillet- β parallèle	-119	113
Feuillet- β antiparallèle	-139	135

¹ tirées de IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature (1970).

Nous profitons du fait que nous venons de présenter les angles de torsion du squelette polypeptidique pour présenter les angles de torsion qui décrivent la conformation des chaînes latérales. Les angles de torsion des chaînes latérales sont dénotés par le symbole χ . On attribue une valeur d'angle de torsion χ^i pour chacune des liaisons covalentes substituées des chaînes latérales. Sur la Fig. 1 la chaîne latérale présentée (de la sérine) possède deux angles de torsion χ^i . Le premier (χ^1) autour de la liaison $C^\alpha-C^\beta$ et le second (χ^2 , non-explicité sur la Fig. 1) autour de la liaison $C^\beta-O\gamma$. Pour cette conformation de la chaîne latérale, χ^1 et χ^2 valent respectivement 180° et 0° . Les mêmes règles que pour la description des angles de torsion du squelette polypeptidique s'appliquent pour les angles de torsion χ^i .

1.1.1.1 L'hélice- α

L'existence de l'organisation en hélice- α (Fig. 2) de la chaîne polypeptidique fut postulée par Pauling et collaborateurs avant même que des évidences expérimentales ne viennent l'appuyer (Pauling *et al.* (1951)). L'hélice- α classique de Pauling possède des angles de torsion ψ et ϕ valant respectivement -47° et -57° , contient 3,6 résidus par tour et une translation de 1,5 Å/résidu selon l'axe principal de l'hélice. Le pas de l'hélice vaut donc 5,4 Å par tour. L'organisation en hélice- α de la chaîne polypeptidique est régularisée par la formation de liaisons-H intra-chaîne: les carbonyles (CO) de chaque résidu forment une liaison-H avec le NH du quatrième résidu suivant le long de la chaîne polypeptidique. Les liaisons-H sont pratiquement linéaires et sont parallèles à l'axe de l'hélice. D'un point de vue électrostatique une telle orientation des liaisons-H et de la liaison peptidique a des conséquences importantes. En effet, étant donné que la liaison peptidique possède un moment dipolaire aligné selon la direction des groupements CO et NH, l'orientation des liaisons-H fait en sorte que l'hélice- α possède un macro-dipôle qui est aussi aligné selon l'axe de l'hélice (Wada, A. (1976)).

Il est aussi à noter que l'hélice- α possède un rayon interne défini par les atomes du squelette polypeptidique et un rayon externe défini par la projection radiale des chaînes latérales vers l'extrémité amino. Ces deux quantités seront définies en détail au chapitre 3.

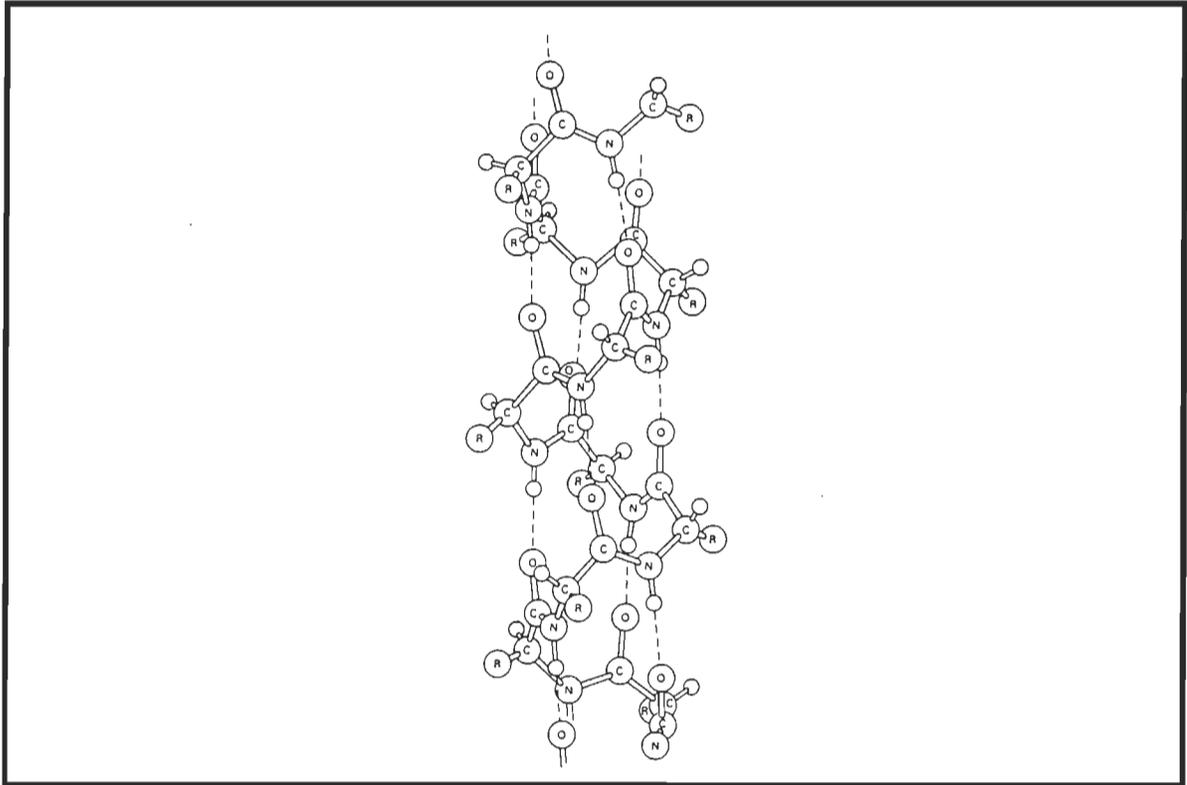


Figure 2. Schéma d'une hélice- α classique.

1.1.1.2 Feuillets- β antiparallèle et parallèle

L'organisation de la chaîne polypeptidique en feuillet- β (Fig. 3) fut décrite pour la première fois par Pauling et Corey en 1951 (Pauling et Corey (1951)). Dans cette organisation, l'unité de base est le brin- β . Le brin- β peut être considéré comme une hélice avec deux résidus par tour. La conformation du brin- β n'est stable que si le brin est incorporé dans un feuillet- β à l'intérieur duquel des liaisons-H inter-brins sont formées.

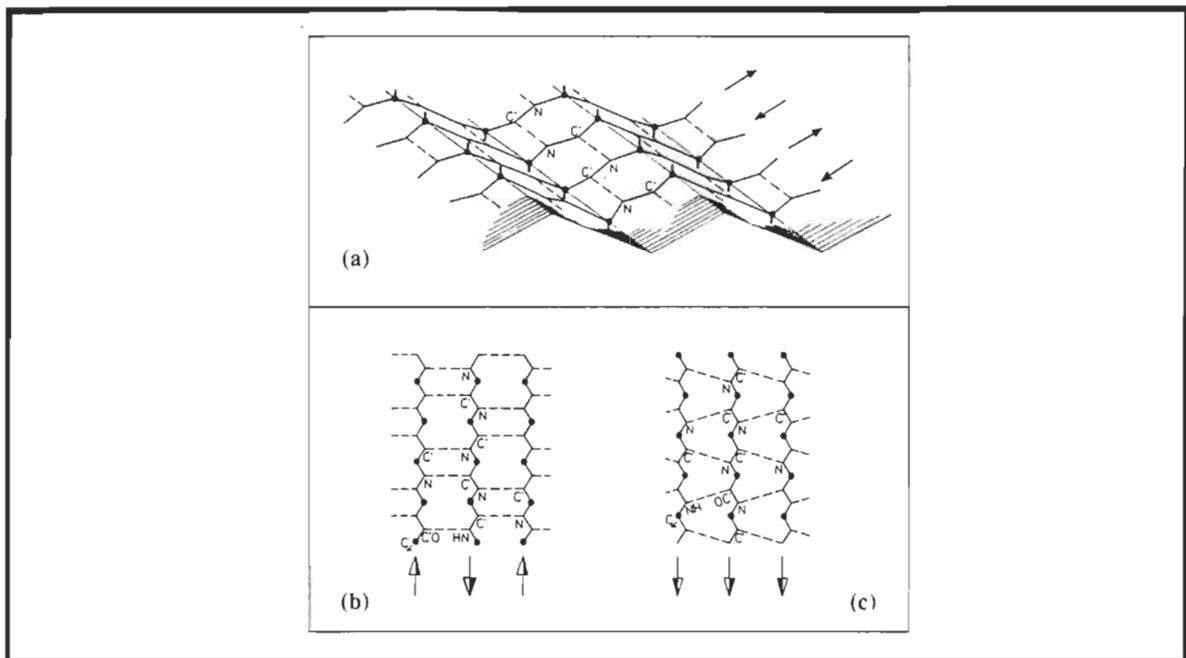


Figure 3. a-représentation schématique d'un feuillet- β antiparallèle en perspective. Les C^α sont représentés par les points et la direction de la liaison $C^\alpha-C^\beta$ par les courtes barres. b et c-représentations de vues du dessus d'un feuillet- β antiparallèle et d'un feuillet- β parallèle. Les flèches indiquent la direction des brins et les pointillés les liaisons-H inter-brins. Tirée de Schulz et Schirmer (1979).

Comme structure secondaire, le feuillet- β diffère de l'hélice- α par la formation de liaisons-H entre résidus éloignés sur la séquence de la chaîne polypeptidique par opposition à la formation de liaisons-H entre résidus rapprochés sur la structure primaire pour l'hélice- α . De plus, les chaînes latérales sont successivement projetées vers le haut et vers le bas avec un angle d'environ 90° par rapport au plan formé par les brins des feuillets.

Il existe deux types de feuillets- β différents dépendant de l'orientation relative des brins. Ainsi, lorsque les brins ont le même sens (sens extrémité

amino vers extrémité carboxy) on obtient un feuillet- β parallèle (Fig. 3c). Lorsque les brins ont des directions inverses on obtient un feuillet- β antiparallèle (Fig. 3b). Les valeurs des angles de torsion ψ et ϕ des squelettes polypeptidiques sont différentes pour les deux types de feuillets. En effet, afin de maximiser la géométrie de la liaison-H inter-brins les angles de torsion ψ et ϕ valent respectivement 113° et -119° pour un feuillet- β parallèle et 135° et -139° pour un feuillet- β antiparallèle (Tableau 1 et IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature (1970)). La différence entre ces valeurs d'angles de torsion résulte en une différence entre la distance entre deux résidus. En effet, cette distance vaut environ $3,25 \text{ \AA}$ pour un feuillet- β parallèle et environ $3,45 \text{ \AA}$ pour le feuillet- β antiparallèle (Salemme, F. R. (1983) et Creighton, T. E. (1993)). La distance entre deux résidus sur un brin dans un feuillet- β antiparallèle est plus élevée parce que les valeurs des angles de torsion ψ et ϕ sont plus près de la valeur de 180° représentant une conformation complètement étendue. De plus, la distance entre les brins vaut environ $4,7 \text{ \AA}$ pour les deux types de feuillets avec une longueur de la liaison-H inter-brins typique définie par la distance entre les atomes N et O d'environ $2,8 \text{ \AA}$ (Ashida *et al.* (1981)). Du point vue électrostatique, l'organisation du squelette polypeptidique en feuillet- β antiparallèle et en feuillet- β parallèle ne possède pas de moment dipolaire résultant (Van Duijnen *et al.* (1985)).

1.1.1.3 Les boucles- β

Environ le tiers des résidus d'une protéine est impliqué dans des boucles qui permettent à la chaîne polypeptidique de se replier sur elle-même et prendre une structure compacte. Il est alors de mise de considérer ces boucles comme une troisième classe de structure secondaire (Creighton, T. E. (1993)). Les boucles les mieux caractérisées sont celles qui relient les brins d'un feuillet- β antiparallèle *i.e.* les boucles- β (Fig.4).

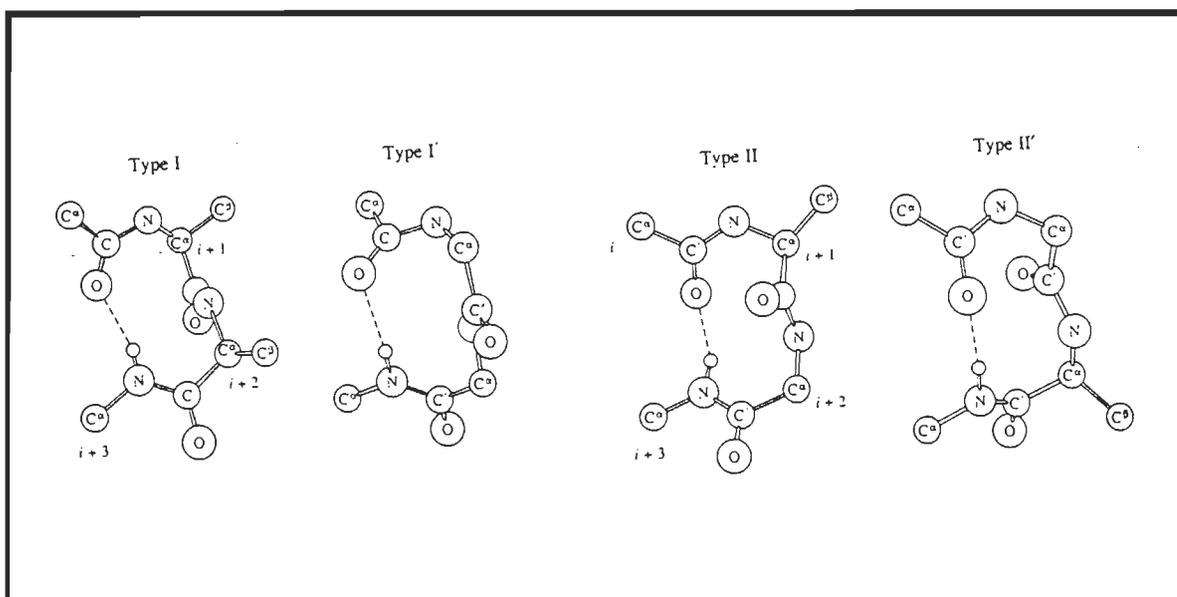


Figure 4. Structures des boucles- β les plus communes. Le pointillé indique la dernière liaison-H du feuillet- β antiparallèle. Tiré de Creighton, T. E. (1993).

Nous ne présentons que les caractéristiques structurales sommaires des boucles- β les plus communes *i.e.* les boucles- β de type I et II. Les boucles- β de type I et II sont formées de quatre résidus (i , $i+1$, $i+2$ et $i+3$) dont deux

d'entre eux ne sont pas impliqués dans une liaison-H inter-brins. Les différences entre les deux types de boucles reposent sur les différences qui existent au niveau des angles de torsion ψ et ϕ des résidus $i+1$ et $i+2$ (Creighton, T. E. (1993)). Une description des différents types de boucles reliant les hélices- α entre elles ainsi que les hélices- α et les brins- β est présentée ailleurs (Efimov, A. V. (1993)).

1.1.2 Eléments de structures tertiaires

Pour les besoins du présent travail, nous nous limiterons à la description de la structure tertiaire de protéines formées que de feuillets- β et que d'hélices- α .

1.1.2.1 Les entassements hélice- α -hélice- α

Nous décrivons au cours de cette section les modes d'entassement (packing) des hélices- α observés chez les protéines dont la structure tertiaire ou le motif, consiste essentiellement d'un entassement d'hélices- α alignées de façon quasi-parallèle. Les motifs consistant en un alignement d'hélices- α quasi-parallèles les mieux connus sont: 1- l'entassement de quatre hélices- α (4 α -helix bundle, Weber et Salemme (1980)) et 2- les super-hélices tordues (coiled coils, Cohen et Parry (1986) et Crick, F. H. C. (1952 et 1953)). Nous nous limiterons seulement à la description de ces deux types d'arrangements puisqu'ils sont les plus susceptibles de nous informer pour le reste du présent travail.

La façon dont les hélices- α s'entassent est régie par la morphologie de leur surface. Deux modes d'interaction sont décrits dans la littérature: 1- le mode "ridges into grooves", ou en traduction libre, "saillies dans les crevasses" (Chothia *et al.* (1981) et Chothia et Finkelstein (1990)) et 2- le mode "knobs into holes" ou "bosses dans les trous" (Crick, F. H. C. (1952 et 1953)). Il n'y a pas de traductions officielles pour ces deux modes. Nous décrivons les bases de ces deux modes d'entassement dans les paragraphes qui suivent.

Afin de décrire brièvement la morphologie de la surface des hélices- α nous présentons à la Fig. 5 un schéma d'une hélice- α de poly-L-alanine qui tient compte du rayon de van der Waals des C^β de la chaîne latérale. On peut remarquer que les C^β des chaînes latérales qui sont séparés par quatre résidus sur la séquence *e.g.* les résidus 7, 11, 15 et 19 et les résidus 4, 8 et 12 forment deux saillies bordant une crevasse. Ces crevasses et saillies sont appelées crevasses et saillies $i \pm 4n$. De la même façon nous pouvons remarquer la présence de saillies et de crevasses $i \pm 3n$. Pour les protéines dont le motif est plutôt allongé comme l'entassement de quatre hélices- α , les hélices- α s'entassent de façon à ce que les chaînes latérales qui forment les saillies $i \pm 3$ s'interdigitent dans les crevasses $i \pm 4$ (Chothia *et al.* (1981) et Chothia et Finkelstein (1990)). Pour un tel entassement, les axes des hélices forment un angle de 20° entre eux (Chothia *et al.* (1981) et Chothia et Finkelstein (1990)).

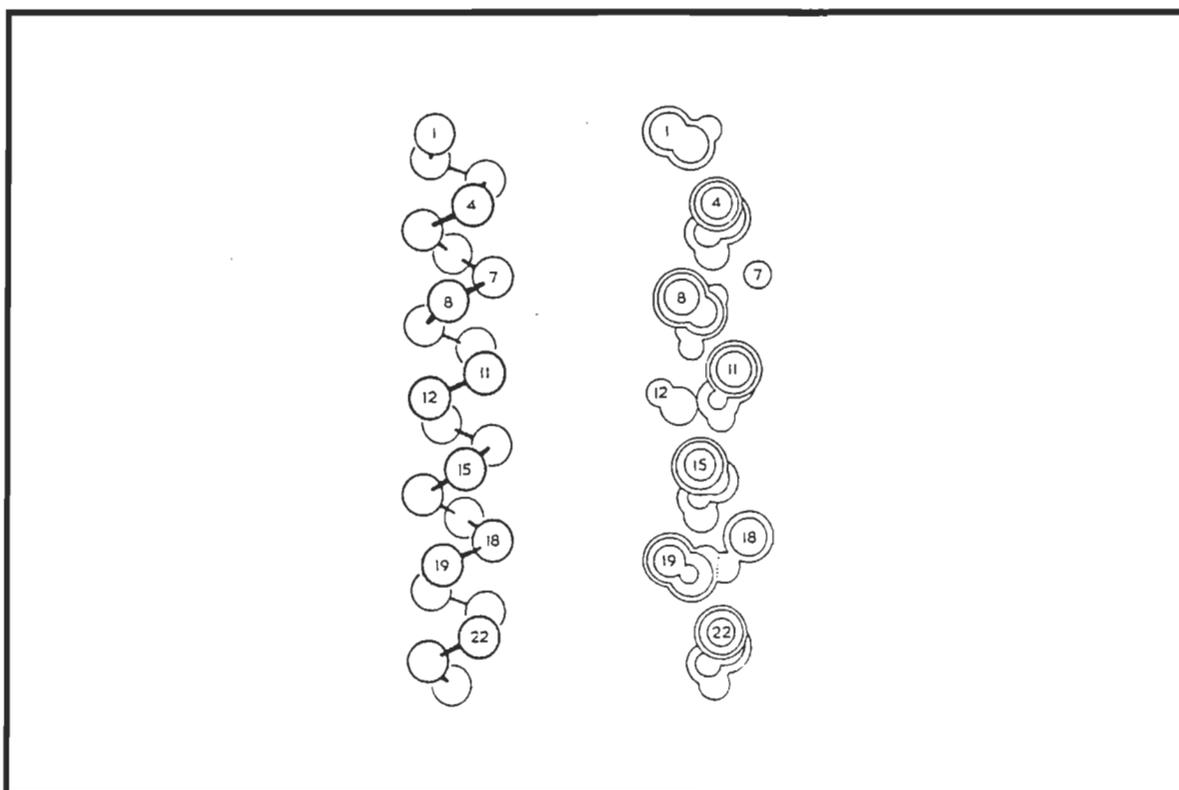


Figure 5. Représentation schématique d'une hélice- α de poly-L-alanine. Tirée de Chothia *et al.* (1981).

En se référant de nouveau à la Fig. 5, nous pouvons aussi remarquer la présence de trous sur l'hélice- α . Ces trous sont formés par les résidus dont la position est donnée par une suite du type $i, i+3, i+4$ et $i+7$. Par exemple, on peut remarquer les deux trous formés par les résidus 8, 11, 12 et 15 et les résidus 15, 18, 19 et 22. C'est à partir de ces observations que Crick proposa le mode d'entassement "bosses dans les trous" afin d'expliquer la présence d'une réflexion méridionale non-prédite et située à 5,1 Å sur les patrons de diffraction des rayons-X de l' α -kératine, une protéine fibreuse

(Crick, F. H. C. (1952 et 1953)). Dans ce mode d'entassement, les hélices s'interdigitent en plaçant leurs chaînes latérales (bosses) dans les trous présents sur l'autre hélice et *vice versa*.

Ce mode d'entassement déforme légèrement les hélices- α qui s'enroulent l'une autour de l'autre pour former dans le cas d'un dimère une super-hélice à deux brins tordus ou en anglais "two-stranded α -helical coiled-coils". La légère déformation qui résulte de la formation d'une super-hélice se traduit par l'existence d'un angle de 20° entre les axes des hélices tout au long de la super-hélice et d'un pas valant 5,1 Å plutôt que 5,4 Å. Ce mode d'entassement d'hélices- α n'est pas limité au cas d'une paire d'hélices. En effet, ce mode d'entassement est observé pour des protéines formées par l'entassement de plusieurs hélices- α , allant de trois jusqu'à sept (Dunker et Zaleske (1977) et Cohen et Parry (1986)).

1.1.2.2 Les entassements de feuillets- β

La structure tertiaire des protéines majoritairement formées de feuillets- β peut être décrite par un arrangement face à face ou en sandwiches de deux feuillets- β indépendants (Cohen *et al.* (1981)). L'orientation mutuelle des feuillets- β dans ces sandwiches est décrit par l'angle formé entre les brins de chaque feuillet. De façon générale les feuillets- β peuvent avoir des orientations mutuellement orthogonales ou alignées (Chothia, C. (1984) et Chothia et Finkelstein (1990)).

De plus lorsque l'on retrouve à l'interface des deux feuillets des résidus du type Leucine, Valine et Isoleucine, les chaînes latérales d'un feuillet s'intercalent dans les espaces formés par les chaînes latérales situées sur l'autre feuillet (Cohen *et al.* (1981)). Une description plus complète des entassements de feuillets- β devrait inclure le fait que ces derniers sont généralement tordus (Chothia, C. (1984) et Chothia et Finkelstein (1990)). Cependant pour le présent travail la description simplifiée et succincte donnée dans cette section est suffisante. Le lecteur intéressé à la déformabilité des feuillets- β est prié de consulter les deux ouvrages cités.

1.2. La stabilité des protéines globulaires

1.2.1 Généralités sur la stabilité des protéines globulaires

La stabilité des protéines globulaires peut se définir comme le travail que l'on doit fournir pour briser les interactions responsables du maintien de leur structure native. De façon plus formelle, elle peut aussi se définir comme la différence d'énergie libre entre l'état dénaturé (G_d) et l'état natif de la protéine (G_n), *i.e.* l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}).

$$\Delta G_{stab} = G_d - G_n \quad (1.1)$$

La dénaturation thermique des protéines globulaires étudiée par calorimétrie différentielle à balayage permet la détermination précise de l'énergie libre de stabilisation (Privalov et Khechinashvili (1974), Privalov, P. L. (1979)) et Privalov et Gill (1988)). De façon générale, l'énergie libre

de stabilisation des protéines globulaires de poids moléculaire inférieur à 20 kDa est de l'ordre de +5 à +15 kcal/mol (Privalov et Khechinashvili (1974), Privalov, P. L. (1979)) et Privalov et Gill (1988)).

D'un autre côté, la dénaturation thermique des protéines globulaires de poids moléculaire plus petit que 20 kDa est un processus hautement coopératif et réversible (Privalov, P. L. (1979) et Freire et Murphy (1991)). Ce résultat nous indique que la dénaturation thermique de ces protéines globulaires correspond à un équilibre n'impliquant que les états natifs et dénaturés de celles-ci. Il appert donc que la stabilité des structures secondaires (et des intermédiaires possibles) est marginale. Ainsi, la stabilisation des protéines globulaires (et des structures secondaires) de poids moléculaire plus petit que 20 000 repose sur la formation et la stabilisation de la structure tertiaire (Freire et Murphy (1991)). C'est donc à la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires que nous nous intéresserons.

La dénaturation thermique des protéines globulaires ne peut cependant nous renseigner directement sur la nature et la force des différentes interactions non-covalentes responsables de la stabilité des protéines globulaires (Makhatadze et Privalov (1993)).

1.2.2 Généralités sur l'organisation des protéines globulaires

L'étude de l'organisation des protéines globulaires peut nous renseigner sur les interactions non-covalentes qui jouent un rôle important dans leur stabilisation. Par exemple, l'idée qui veut que les protéines globulaires s'organisent de façon à enfouir leurs résidus hydrophobes et à exposer leurs résidus polaires à leur surface prédite par Kauzmann en 1959 (Kauzmann, W. (1959)), met en relief l'importance de l'interaction hydrophobe comme force agissante responsable de cette présumée organisation. Depuis la publication de cet article de Kauzmann, il existe un consensus concernant l'importance de l'interaction hydrophobe sur la stabilité et le repliement des protéines globulaires (Dill K. A. (1990), Livingstone et al.(1991), Creighton, T. E. (1993)) et Privalov et Makhatadze (1993)). Cependant, l'organisation réelle des protéines globulaires est un peu plus compliquée que celle d'un intérieur strictement apolaire et d'une surface strictement polaire.

Afin de préciser la nature (polaire ou apolaire) des atomes formant soit l'intérieur soit la surface des protéines globulaires, Lee et Richards (Lee et Richards (1971)) ont développé un algorithme qui permet de calculer l'accessibilité ou le degré d'exposition au solvant de chacun des résidus d'une protéine à partir de coordonnées atomiques. Cet algorithme permet ainsi de déterminer la nature des atomes qui sont enfouis (ou inaccessibles) et de ceux qui sont en contact avec l'eau à la surface de la protéine.

1.2.3 Nature des atomes formant l'intérieur et la surface des protéines globulaires

L'algorithme de Lee et Richards, qui fut par la suite adapté et amélioré par d'autres chercheurs (Miller *et al.* (1987)), est schématisé sur la Fig. 6.

On ajoute d'abord à chaque atome de la protéine la valeur de son rayon de van der Waals. On obtient ainsi la surface de van der Waals de la protéine. La protéine est ensuite divisée en plusieurs de tranches. Une molécule d'eau imaginaire et sphérique de rayon défini est alors déplacée sur les tranches de surfaces de van der Waals de la protéine. La surface accessible de chaque tranche (et de chaque atome) est définie par le centre de la molécule d'eau imaginaire et la surface de van der Waals. Ainsi nous pouvons remarquer que les atomes 3, 8 et 9 du modèle sur la Fig. 6 sont inaccessibles et font ainsi partie de l'intérieur de la protéine.

Miller et collaborateurs (Miller *et al.* (1987)) ont déterminé selon cette approche la nature des atomes formant l'intérieur et la surface de 46 protéines globulaires de poids moléculaires allant de 4 à 35 kDa. Les résultats qu'ils ont obtenus peuvent paraître surprenants à première vue. En effet, selon ces auteurs, la surface des protéines qu'ils ont étudiées est formée en moyenne de 57% d'atomes apolaires (atomes de carbone), 24% d'atomes polaires non-chargés (atomes d'oxygène, d'azote et de soufre) et 19% d'atomes chargés (atomes d'oxygène et d'azote). De façon encore plus

surprenante, l'intérieur de ces protéines est formé en moyenne de 58% d'atomes apolaires, 38% d'atomes polaires non-chargés et 4% d'atomes chargés. Les protéines globulaires enfouissent vers l'intérieur plus d'atomes polaires qu'elles n'en exposent à leur surface!

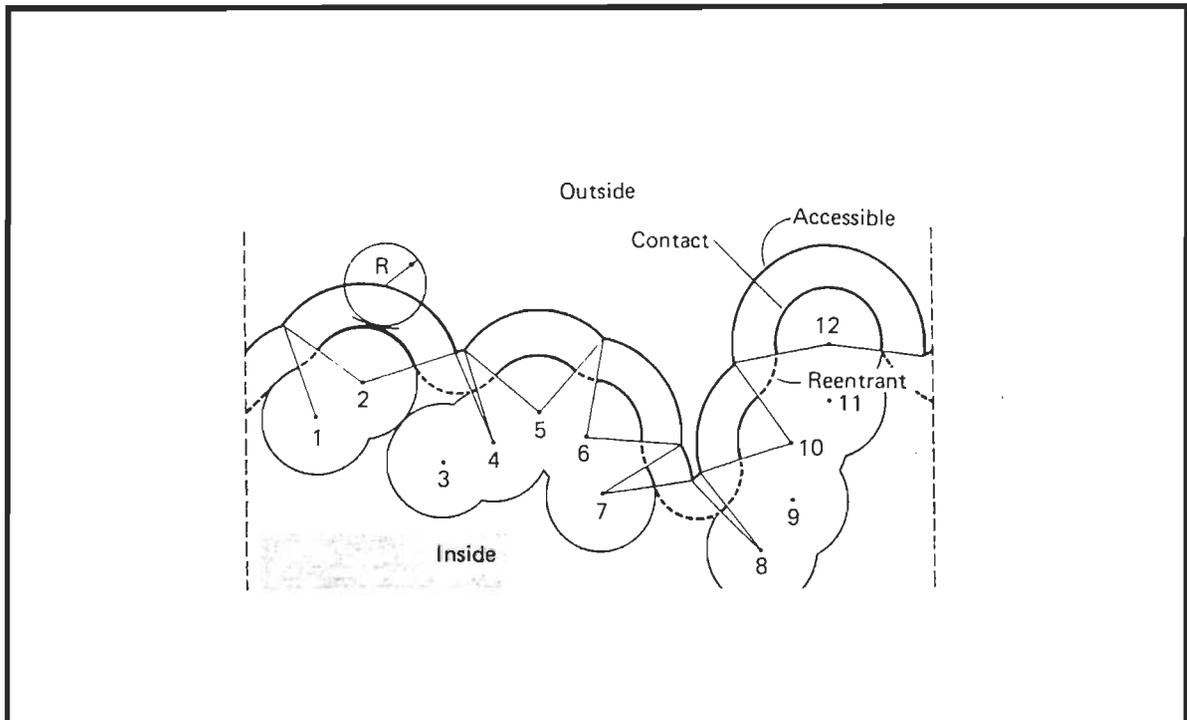


Figure 6. Analyse des surfaces accessible et inaccessible d'une protéine globulaire. Schéma d'une section d'une tranche d'une protéine globulaire. Les détails sont donnés dans le texte (tiré de Creighton, T. E. (1993)).

Ce résultat peut sembler contraire à l'image classique d'un intérieur complètement hydrophobe des protéines globulaires tel que proposé par Kauzmann (Kauzmann, W. (1959)). Cependant, dans une étude antérieure semblable mais portant sur un nombre plus restreint de protéines, Chothia (Chothia, C. (1976)) réhabilite en quelque sorte la vision de Kauzmann. En

effet, Chothia a montré que l'interface des structures tertiaires est majoritairement constituée d'un entassement serré de chaînes latérales aliphatiques et aromatiques. Les chaînes latérales aliphatiques et aromatiques se partitionnent donc préférentiellement vers l'interface de la structure tertiaire des protéines globulaires. Ainsi, ce seraient les interactions non-covalentes entre les chaînes latérales aliphatiques et aromatiques retrouvées à l'interface des structures tertiaires des protéines globulaires qui serait en grande partie responsable de leur stabilité (Chothia, C. (1976) et Miller *et al.* (1987)).

Evidemment, les chaînes latérales portant des groupements polaires et ionisables comme la Lysine et l'Arginine, par exemple, se partitionnent préférentiellement à la surface des protéines globulaires. Il faut cependant noter que les chaînes latérales polaires et ionisables possèdent toutes une portion apolaire. Ces chaînes latérales font en sorte que la surface des protéines globulaires soit composée d'autant d'atomes de carbone. De plus, la surface accessible des protéines globulaires dans un état étendu (dénaturé) est composée d'environ 58% d'atomes apolaires, 32% d'atomes polaires et 9% d'atomes chargés (Miller *et al.* (1987)). Compte tenu de la nature hiérarchique de la structure tridimensionnelle des protéines, il semble assez évident que, lors de leur repliement, ces dernières sont contraintes à n'enfouir qu'une partie seulement de leurs atomes apolaires. En effet, lors de leur repliement, les protéines globulaires ne réduisent que d'environ 60% leur surface accessible apolaire totale (Chothia, C. (1976) et Miller *et al.* (1987)). De ce 60 %, environ 30 % est rendu inaccessible suite à la

formation des structures secondaires et le 70 % restant est enfouit à l'interface des structures tertiaires suite à l'entassement des chaînes latérales hydrophobes situées sur la surface des structures secondaires en contact (Chothia, C. (1976)).

D'un autre côté, la nature partiellement apolaire de la surface accessible des protéines globulaires permet de moduler leur solubilité et peut avoir des conséquences sur leur fonction. Par exemple, les protéines de structure sont généralement peu solubles dans l'eau et participent à l'édification de complexes macromoléculaires. L'oligomérisation de protéines de structure s'effectue par l'interaction entre les surfaces apolaires retrouvées sur les monomères (Janin et Chothia (1976) et Janin *et al.* (1988)).

La grande majorité des atomes polaires rendus inaccessibles appartiennent au squelette polypeptidique et sont impliqués dans la formation de liaisons-H à l'intérieur des structures secondaires (Chothia, C. (1976) et Miller *et al.* (1987)). Cependant environ 10% des atomes polaires rendus inaccessibles suite au repliement des protéines sont situés sur des chaînes latérales et forment des liaisons-H tertiaires avec d'autres chaînes latérales polaires ou avec le squelette polypeptidique d'une autre structure secondaire (Chothia, C. (1976) et Baker et Hubbard (1984)). Il n'existe donc que très peu d'atomes polaires enfouis qui ne sont pas impliqués dans une liaison-H (Schulz et Schirmer, (1979) et Baker et Hubbard, (1984)). En effet, la présence de donneurs ou d'accepteurs de liaisons-H non-pairés à

l'intérieur d'une protéine globulaire peut s'avérer très défavorable pour la stabilité des protéines globulaires (Alber *et al.* (1987) et Privalov et Makhatadze (1993)). Les 4% d'atomes chargés enfouis forment des ponts ioniques (Schulz et Schirmer (1979) et Baker et Hubbard (1984)) ou sont "solvatés" par des liaisons-H (Alber, T. (1989)). Puisque la quantité d'atomes chargés qui sont enfouis est faible par rapport aux atomes non-polaires et polaires non-chargés, leur contribution *via* des interactions électrostatiques à la stabilité des protéines globulaires ne sera pas discutée davantage dans ce travail. Le lecteur intéressé est invité à consulter l'excellente revue d'Alber.

Les atomes chargés retrouvés à la surface des protéines y seraient localisés pour augmenter la solubilité des protéines globulaires dans l'eau (Miller *et al.* (1987)). En effet, l'importante proportion d'atomes apolaires à la surface doit être compensée par la présence d'atomes polaires mieux solvatables que des atomes de carbone. Leur contribution à la stabilité des protéines soit par des effets à longue portée ou par la formation de ponts salins semble par contre très marginale (Matthews, B. W. (1993)). Le lecteur intéressé est prié de consulter la revue de B. W. Matthews (Matthews B. W. (1993)).

Les atomes polaires non chargés retrouvés à la surface des protéines sont impliqués en grande majorité dans des liaisons-H à l'intérieur des boucles reliant les différents éléments de structures secondaires et entre donneurs et accepteurs situés sur des chaînes latérales voisines (Baker et

Hubbard (1984)). Le reste des atomes polaires accessibles à la surface des protéines qui ne sont pas impliqués dans des liaisons-H avec d'autres atomes de la protéine forment des liaisons-H ou des interactions de van der Waals avec les molécules d'eau environnantes. Cependant, à l'instar de la faible force des ponts ioniques retrouvés à la surface des protéines (Matthews, B. W. (1993)) la force des liaisons-H situées aussi à la surface des protéines devrait également être faible.

En résumé, les protéines globulaires sont stabilisées par l'optimisation des contacts entre leurs résidus hydrophobes et, en plus faible proportion, par la formation de liaisons-H aux interfaces de leurs structures tertiaires. Ceci entraîne vers l'intérieur une quantité de surface polaire non-négligeable. De plus, le terme optimisé n'est pas superflu car la densité d'entassement des atomes à l'intérieur d'une protéine globulaire est comparable à celle d'un cristal d'acide aminé (Richards, F. M. (1977)).

1.2.3.1 L'intérieur d'une protéine vu comme un solide

La densité d'entassement (packing) est définie comme le volume occupé par les atomes à l'intérieur de la protéine lorsque ceux-ci sont délimités par leurs rayons de van der Waals. La densité d'entassement typique des atomes à l'intérieur d'une protéine est d'environ 75% (Creighton, T. E. (1993)). En comparaison, la densité d'entassement maximale pour des sphères rigides de rayons semblables à ceux des atomes des protéines est de 74% et celle de cristaux de petites molécules organiques varie de 70 à 78% (Schulz et

Schirmer (1979)). D'un autre côté, la densité d'entassement d'un liquide comme le cyclohexane est de 40 % (Creighton, T. E. (1993)). Les atomes à l'intérieur d'une protéine sont donc en contact étroit indiquant ainsi que les forces de van der Waals entre les atomes polaires de même que les liaisons-H sont maximisées. D'un autre côté, si la très grande densité d'entassement des atomes à l'intérieur des protéines globulaires permet de maximiser les interactions non-covalentes, elle génère en contre-partie une perte d'entropie conformationnelle qui tend à déstabiliser la forme native des protéines globulaires. Cette perte d'entropie conformationnelle se situe au niveau de l'immobilisation du squelette polypeptidique et des chaînes latérales (Pickett et Sternberg, (1993)).

1.2.4 Vue globale de la stabilité des protéines globulaires

Comme les protéines globulaires existent en milieu aqueux, toute tentative de quantification des forces responsables de la stabilité des protéines doit tenir compte des effets d'hydratation des différents atomes, polaires et apolaires.

Donc, de façon globale, la stabilité des protéines globulaires dépend à la fois de l'énergie qui doit être fournie pour briser les liaisons non-covalentes (polaire et apolaire) retrouvées au sein des protéines globulaires, de l'énergie libre d'hydratation des groupes qui deviennent exposés au solvant ainsi que du gain en entropie conformationnelle du squelette polypeptidique et des chaînes latérales suite à la dénaturation. Les

différentes contributions à l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) d'une protéine globulaire peuvent donc être résumées par la relation (Murphy et Freire (1992)):

$$\Delta G_{\text{stab}} = \Delta G_{\text{ap}} + \Delta G_{\text{pol}} + \Delta G_{\text{conf}} \quad (1.2)$$

ΔG_{ap} représente la balance entre la variation d'énergie libre associée au bris des liaisons de van der Waals non-polaires au sein de la protéine et à la variation de l'énergie libre d'hydratation de ces atomes lorsqu'ils sont exposés à l'eau suite à la dénaturation. De la même façon, ΔG_{pol} représente le bilan de la variation d'énergie libre associée au bris des liaisons de van der Waals polaires et des liaisons-H et de la variation de l'énergie libre d'hydratation de ces atomes. La variation de l'énergie libre associée au gain d'entropie conformationnelle de la chaîne polypeptidique suite à la dénaturation est représentée par ΔG_{conf} . Nous verrons que l'énergie libre de stabilisation des protéines globulaires et de leurs structures tertiaires consiste en une fine balance de forces qui s'opposent.

Nous ferons un bref survol de ces trois différentes contributions dans les sections qui suivent.

1.2.4.1 Contributions des atomes polaires

Comme nous venons de le mentionner, une contribution nette à la stabilisation des protéines globulaires par des interactions non-covalentes impliquant les atomes polaires soit par l'intermédiaire d'interactions de type van der Waals ou par des liaisons-H dépend de la balance entre la force de ces interactions au sein des protéines et la force de l'hydratation de ces atomes par l'eau (Privalov et Makhatdze (1993)). Certains auteurs prétendent que la force des liaisons-H et des interactions de type van der Waals polaires brisées lors de la dénaturation des protéines globulaires serait compensée par la force des liaisons-H et des interactions de type van der Waals entre les atomes polaires et les molécules d'eau. Par conséquent, ces interactions ne contribueraient pas à la stabilisation des protéines globulaires (Dill, K. A. (1990) et Creighton, T. E. (1993)). Cependant, nous devons souligner les résultats d'une étude par mutagenèse dirigée qui indique que les liaisons-H formées par contacts tertiaires entre chaînes latérales stabilisent effectivement les protéines globulaires (Alber *et al.* (1987)). Ces études montrent que la mutation d'une chaîne latérale inaccessible au solvant et impliquée dans une liaison-H peut déstabiliser la forme native des protéines globulaires d'environ 1,0 kcal/mol.

D'un autre côté, la force des liaisons-H retrouvées au sein des structures secondaires est marginale, du moins en ce qui concerne les hélices- α isolées dans l'eau ((Creamer et Rose (1992) et Creighton, T. E. (1993)). C'est en fait l'énergie libre d'hydratation favorable des atomes

polaires du squelette polypeptidique (Ooi et Oobatake (1991)) et la perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales (Creamer et Rose (1992)) qui s'opposent à la formation d'hélices- α isolées dans l'eau et à leur stabilité. L'énergie libre d'hydratation des atomes polaires du squelette polypeptidique pourrait atteindre jusqu'à -0,8 kcal par mole de résidus. Cette valeur est basée sur l'énergie libre d'hydratation d'un résidu Glycine (-CO-CH₂-NH-) (Oobatake et Ooi (1993)). Il n'existe pas à notre connaissance de modèle permettant d'estimer la force de la liaison-H inter-brins, l'effet de l'énergie libre d'hydratation de même que la perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales sur la stabilité intrinsèque des feuillets- β isolés. En contrepartie, comme pour l'hélice- α , il est permis de croire que l'énergie libre d'hydratation des atomes du squelette polypeptidique des feuillets- β et la perte d'entropie des chaînes latérales s'opposeront à la formation des liaisons-H inter-brins en solution aqueuse.

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, c'est l'interaction hydrophobe et, en plus faible proportion, les liaisons-H situées au sein de la structure tertiaire des protéines globulaires qui contrebalancent pour la stabilité marginale des structures secondaires isolées (Freire et Murphy (1991)). Ainsi, la force des liaisons-H retrouvées au sein des structures secondaires et à la surface des protéines serait juste assez grande pour guider la chaîne polypeptidique à prendre sa structure native spécifique lors de son repliement (Schulz et Schirmer (1979)).

Finalement, l'hydratation des atomes polaires du squelette polypeptidique favorise toujours la forme dénaturée des protéines globulaires (Oobatake et Ooi (1993) et Privalov et Makhatadze (1993)). L'énergie libre d'hydratation de ces atomes polaires est directement proportionnelle à leur surface accessible (Oobatake et Ooi (1993) et Privalov et Makhatadze (1993)).

1.2.4.2 La perte d'entropie conformationnelle

Outre l'hydratation des atomes polaires du squelette polypeptidique, la perte d'entropie conformationnelle que subissent les protéines suite à leur repliement est une autre force dominante qui tend à diminuer la stabilité de la forme native des protéines au profit de la forme dépliée (Dill, K. A. (1990), Murphy et Freire (1992) et Pickett et Sternberg (1993)). Cette perte d'entropie conformationnelle provient, entre autre, du fait que le nombre de conformations du squelette polypeptidique dans la forme native des protéines est très restreint par rapport au grand nombre de conformations différentes qu'il peut prendre dans la forme dénaturée. Cette perte d'entropie conformationnelle provient aussi du fait que lors de leur enfouissement vers l'intérieur de la forme native des protéines, les chaînes latérales voient leur nombre de rotamères considérablement réduit par rapport au nombre de rotamères qu'elles peuvent adopter lorsqu'elles sont en contact avec l'eau dans la forme dénaturée.

Pickett et Sternberg (Pickett et Sternberg (1993)) ont évalué la perte d'entropie conformationnelle subite par les différentes chaînes latérales lors de leur enfouissement vers l'intérieur des protéines. Par exemple, à 300 K, la déstabilisation associée à la perte d'entropie conformationnelle ($-T \cdot \Delta S$) est nulle pour la chaîne latérale de l'Alanine et vaut 0,51 et 0,78 kcal/mol pour les chaînes latérales de la Valine et de la Leucine respectivement. La perte d'entropie conformationnelle du squelette polypeptidique ne sera pas discutée davantage car elle déborde le cadre de notre travail. Les personnes intéressées sont invitées à consulter l'ouvrage de Pickett et Sternberg et les références qui y sont citées.

1.2.4.3 L'interaction hydrophobe

Kauzmann (Kauzmann, W. (1959)) fut le premier à proposer l'importance de la "liaison hydrophobe" ou la ségrégation des résidus hydrophobes sur la stabilité des protéines globulaires. L'origine de cette proposition vient de l'analyse des changements thermodynamiques accompagnant le transfert d'hydrocarbures d'un solvant organique vers l'eau à la température de la pièce. Ce processus mime en quelque sorte la dénaturation d'une protéine: des atomes apolaires passent d'un milieu hydrophobe à un milieu aqueux. La variation d'entropie accompagnant le transfert (ΔS_{tr}) est toujours négative et très grande en valeur absolue. La variation d'enthalpie accompagnant le transfert (ΔH_{tr}) est plus petite que zéro et beaucoup plus faible en valeur absolue que $T \cdot \Delta S_{tr}$ de telle sorte que la variation d'énergie libre du transfert ΔG_{tr} ($\Delta G_{tr} = \Delta H_{tr} - T \cdot \Delta S_{tr}$) est plus

grande que zéro. La diminution d'entropie lors du transfert résulte de la formation de régions de molécules d'eau organisées autour des atomes apolaires lorsque ces derniers viennent en contact avec l'eau (Kauzmann, W. (1959) et Gill *et al.* (1985)). Donc, afin de maximiser l'entropie de l'eau environnante, les protéines globulaires s'organisent spontanément de façon à minimiser les contacts entre les atomes apolaires de leurs résidus et l'eau. C'est l'effet hydrophobe (Tanford, C. (1980)). Nous atteignons ici un point de controverse dans la littérature à savoir quelle appellation décrit le mieux l'implication de la ségrégation des résidus hydrophobes sur la stabilité des protéines globulaires: la liaison hydrophobe, l'effet hydrophobe ou l'interaction hydrophobe? À l'origine (Kauzmann, W. (1959)), le terme "liaison hydrophobe" fut utilisé pour désigner la ségrégation des résidus apolaires causé par l'effet hydrophobe, un effet entropique. Cependant, on retrouve dans la littérature plus récente (Fu et Freire (1992)) une autre définition de l'effet hydrophobe qui inclut l'effet entropique (solvation des résidus apolaires) et les interactions de type van der Waals entre les atomes des résidus apolaires à l'intérieur des protéines globulaires. Selon ces derniers auteurs le bris des interactions de type van der Waals et l'hydratation des atomes apolaires constitue l'effet hydrophobe. Cette définition décrit de façon plus précise l'implication des résidus apolaires sur la stabilité des protéines globulaires mais l'appellation d'effet hydrophobe nous semble par contre inappropriée étant donné qu'elle réfère à l'origine à un effet entropique. Cette définition décrit plutôt ce que nous entendons par interaction hydrophobe et inclut à la fois les interactions de type van der

Waals entre les atomes apolaires à l'intérieur des protéines et l'hydratation défavorable de ces derniers. Quant à l'appellation "liaison hydrophobe", le terme liaison semble plus ou moins approprié compte tenu de la grande portée de la force agissante majeure (effet hydrophobe) en comparaison avec la courte portée des liaisons typiques comme les liaisons-H et les liaisons covalentes (Israelachvili, J. N. (1985)). L'appellation interaction hydrophobe sera utilisée pour le reste de cette thèse.

La force de l'interaction hydrophobe est généralement approximée par la variation de l'énergie libre suite au transfert (ΔG_{tr}) à la température de la pièce des chaînes latérales des acides aminés hydrophobes d'un solvant organique vers l'eau (Creighton, T. E. (1993)). Dans ce type d'expérience, le solvant organique mime l'intérieur hydrophobe des protéines. Les valeurs de ΔG_{tr} les plus souvent citées dans la littérature sont celles de Nozaki et Tanford (Nozaki et Tanford (1971)) et de Fauchère et Pliska (Fauchère et Pliska (1983)).

Les ΔG_{tr} hydrophobes de Nozaki et Tanford sont mesurées à partir de la solubilité des différents acides aminés hydrophobes dans l'eau et dans un solvant organique relativement à la Glycine. Des ΔG_{tr} peuvent être obtenus à partir de la relation thermodynamique: $\Delta G_{tr} = -RT \ln (S_{i,e} / S_{i,o}) + RT \ln (S_{Gly/e} / S_{Gly/o})$ où $(S_{i,e} / S_{i,o})$ représente le rapport entre la solubilité dans le solvant organique et dans l'eau des différents acides aminés hydrophobes (i) et $(S_{Gly/e} / S_{Gly/o})$ représente le rapport entre la solubilité dans le solvant

organique et dans l'eau de la Glycine (Nozaki et Tanford (1971)). R et T représentent respectivement la constante des gaz et la température. Les ΔG_{tr} de Fauchère et Pliska pour les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes ont été estimés à partir du même type de relation que celle utilisée par Nozaki et Tanford mais en utilisant les coefficients de partition entre l'octanol et l'eau des analogues acétyle-X-amide des acides aminés hydrophobes (X représente les différents acides aminés hydrophobes) relativement au coefficient de partition de l'acétyl-glycine-amide (Fauchère et Pliska (1983)).

Nous présentons au Tableau 2 des valeurs de ΔG_{tr} obtenues par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska pour certaines chaînes latérales hydrophobes.

Tableau 2
Quelques valeurs de ΔG_{tr} pour des chaînes latérales hydrophobes
telles que déterminées par Fauchère et Pliska (F.-P.) et Nozaki
et Tanford (N.-T.)

Chaîne latérale	ΔG_{tr} F.-P. (kcal/mol ¹)	ΔG_{tr} N.-T. (kcal/mol)
Glycine	0	0
Alanine	+0,42	+0,50
Valine	+1,66	+1,50
Leucine	+2,32	+1,80

¹ De façon classique les énergies libres de transfert sont données en kcal/mol. Ainsi nous utiliserons ces unités tout au long de ce travail même si dans le Système International l'unité d'énergie est le Joule (J). 1 cal = 4.184 J.

Des valeurs de ΔG_{tr} supérieures à zéro indiquent que les chaînes latérales hydrophobes se partitionneront préférentiellement vers l'intérieur apolaire des protéines globulaires et contribueront ainsi à la stabilisation de ces dernières. Les ΔG_{tr} des chaînes latérales hydrophobes sont directement proportionnels à leur surface accessible. En effet, Chothia (Chothia, C. (1974)) a estimé, à partir des ΔG_{tr} de transfert de Nozaki et Tanford et de la surface accessible des chaînes latérales hydrophobes, une augmentation d'énergie libre de +25 cal/mol par Å² de surface hydrophobe transférée du solvant organique vers l'eau. Il est généralement reconnu que la contribution de l'interaction hydrophobe à la stabilité des protéines globulaires est directement proportionnelle à la quantité de surface apolaire que les protéines enfouissent lors de leur repliement (Spolar *et al.* (1989), Livingstone *et al.* (1991) et Murphy et Freire (1992)).

L'utilisation d'un solvant organique hydrophobe pour mimer l'intérieur d'une protéine globulaire est cependant critiquable. En effet, comme nous l'avons vu, l'intérieur d'une protéine ressemble davantage à un solide qu'à un liquide (Richards, F. M. (1977), Schulz et Schirmer (1979) et Creighton, T. E. (1993)). Par conséquent les ΔG_{tr} des chaînes latérales hydrophobes de Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska ne devraient pas inclure la perte d'entropie conformationnelle que subissent les chaînes latérales hydrophobes lors de leur enfouissement à l'interface des structures tertiaires. De plus, les chaînes latérales hydrophobes "traînent" avec elles le

squelette polypeptidique lors du repliement des protéines. Or, nous avons vu que l'hydratation des atomes polaires du squelette polypeptidique déstabilise les protéines globulaires. Finalement, l'approche de Nozaki et Tanford et de Fauchère et Pliska ne peut tenir compte de la perte de surface accessible des chaînes latérales hydrophobes lorsqu'elles se retrouvent à l'intérieur des structures secondaires. Il est alors permis de croire que la force de l'interaction hydrophobe entre les résidus hydrophobes à l'interface des structures tertiaires des protéines globulaires est plus faible que ce que les ΔG_{tr} de Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska laissent présager.

Dans ce contexte, nous proposons dans ce qui suit une autre approche, à notre avis plus réaliste, pour estimer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires.

1.3 Objet du présent travail: une nouvelle approche pour mesurer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation de la structure tertiaire des protéines globulaires

Notre approche est basée sur l'évaluation de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) de bicouches d'homopolypeptides hydrophobes (chaînes polypeptidiques constituées par la répétition d'un même résidu hydrophobe) formées à partir de leurs films monomoléculaires à l'interface air-eau. Pour des films étalés à l'interface air-eau, les isothermes de pression de surface (Π) - aire résiduelle (A) de ces homopolypeptides

hydrophobes organisés en hélice- α ou en feuillet- β montrent généralement une transition de phase correspondant à la transition d'une organisation monomoléculaire (monocouche) vers une organisation bimoléculaire (bicouche) (Malcolm, B. R. (1973) et Baglioni *et al.* (1983)). La contribution des résidus transférés vers la bicouche à la stabilisation de ces dernières nous apparaît comme un bon modèle expérimental pour évaluer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des structures tertiaires formées exclusivement d'hélices- α ou de feuillets- β . En effet, à l'instar du repliement d'une protéine globulaire, la formation de ces bicouches implique le transfert de résidus d'une phase aqueuse (la surface) où le squelette polypeptidique des homopolypeptides hydrophobes peut être hydraté vers un milieu hydrophobe organisé (la bicouche) où l'entropie conformationnelle des chaînes latérales devrait être réduite.

L'énergie libre de stabilisation des bicouches d'homopolypeptides hydrophobes peut être évaluée à partir de boucles d'hystérèse observées sur les isothermes Π -A lorsque les films d'homopolypeptides hydrophobes sont soumis à des cycles de compression et d'expansion durant leur transition monocouche-bicouche. Au chapitre 5 nous montrons que l'énergie libre de stabilisation est donnée par l'intégration de la surface délimitée par les boucles d'hystérèse. À notre connaissance, nous sommes les premiers à exploiter quantitativement ces boucles d'hystérèse.

Cependant, il est important de bien caractériser la transition monocouche-bicouche ainsi que la conformation à l'interface air-eau des homopolypeptides hydrophobes dont nous étudierons la stabilisation *i.e.* la Poly-L-Alanine (PLA) et la Poly-L-Leucine (PLL). Nous présentons au chapitre 4, une analyse détaillée de la transition monocouche-bicouche de la PLA organisée majoritairement en hélices- α et de la PLL organisée majoritairement en feuillets- β antiparallèles. L'étude de la conformation de ces homopolypeptides est déterminée par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) en utilisant la technique de réflectances internes multiples (MIR) de films Langmuir-Blodgett construits en différents endroits sur les isothermes Π -A. La transition monocouche-bicouche des homopolypeptides étudiés sera modélisée en fonction de leur conformation à l'aide de paramètres structuraux qui sont tirés de la littérature ou déterminés à partir d'un modèle que nous avons développé pour calculer l'aire résiduelle d'homopolypeptides organisés en hélices- α . Les isothermes de potentiel de surface (ΔV) en fonction de l'aire résiduelle (A) de la PLA et de la PLL viennent compléter la caractérisation des transitions monocouche-bicouche.

Nous mesurons la contribution des résidus Alanines à l'énergie libre stabilisation (ΔG_{stab}) de la bicouche de PLA à partir de cycles de compression et d'expansion de la PLA organisée majoritairement en hélices- α à l'interface air-eau. Nous mesurons aussi la contribution des résidus Leucines à la stabilisation de bicouches de PLL organisée majoritairement

en feuillets- β antiparallèles. Les valeurs que nous avons mesurées sont comparées avec les valeurs de ΔG_{tr} de Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska et celles d'une autre échelle qui fut déterminée à partir de coefficients de partition empiriques des résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur des protéines (Miller *et al.* (1987)). Nous discutons aussi du fait que les valeurs de ΔG_{stab} que nous mesurons pour l'Alanine et la Leucine devraient inclure l'effet de la perte d'entropie conformationnelle de la chaîne latérale, de l'hydratation du squelette polypeptidique de même que de la perte de surface accessible des chaînes latérales lorsqu'elles se retrouvent à l'intérieur des structures secondaires.

Afin d'éprouver notre méthodologie (modélisation, isothermes Π -A, ΔV -A et FTIR-MIR) nous avons étudié le comportement interfacial et la conformation à l'interface air-eau d'un homopolypeptide hydrophobe bien caractérisé dans la littérature: le Poly- γ -Benzyl-L-Glutamate (PBLG). De plus, nous précisons certains aspects de son organisation et de son isotherme ΔV -A. Ces résultats sont présentés au chapitre 3.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Pureté des produits

Les trois polypeptides utilisés dans la cadre de cette étude (PLA, PLL et PBLG) ont été achetés de la compagnie Sigma (St-Louis, MO). Ces polypeptides furent utilisés sans aucune purification.

La PLA étudiée dans ce travail avait un poids moléculaire moyen (déterminé par viscosimétrie chez le fournisseur) de 18,8 kDa et un degré de polymérisation correspondant (nombre de résidus par molécule) de 265. La PLL avait un poids moléculaire moyen (viscosité) de 10,2 kDa et un degré de polymérisation de 91 et finalement le PBLG était de poids moléculaire moyen (viscosité) de 23,0 kDa et de degré de polymérisation de 105.

Les solutions de PLA furent obtenues par la solubilisation d'environ 2 mg de polypeptide dans 0,6 ml d'acide dichloroacétique (99+%, Anachemia Canada Inc, Montréal, Qc) utilisé sans aucune purification additionnelle. Ces

solutions furent complétées à 10 ml dans un ballon volumétrique avec du chloroforme (Accusolv, Anachemia Canada Inc, Montréal, Qc) distillé au laboratoire. Les solutions de PLL furent obtenues par la dissolution d'environ 1 mg de ce polypeptide dans précisément 2 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique (99+%, Anachemia Canada Inc, Montréal, Qc) utilisé sans aucune purification additionnelle à 20 % (vol:vol) dans le chloroforme distillé. Le PBLG (environ 3 mg) fut solubilisé directement dans précisément 3 ml de chloroforme distillé. Toutes les pesées furent effectuées au μg près à l'aide d'une microélectrobalance (modèle M25D, Sartorius, Göttingen, Allemagne).

La sous-phase utilisée tout au long de ce travail est de l'eau pure. L'eau fut purifiée en deux étapes. La première consiste en une filtration de l'eau provenant de l'alimentation courante à l'aide d'un système Nanopure (Sybron-Barnstead, Boston, MA). La filtration sur ce système déionise l'eau et la libère des matières organiques et des particules dont le diamètre est supérieur à $0,2 \mu\text{m}$. Suite à cette étape de filtration, l'eau possède une résistivité spécifique supérieure à $17,5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$. La seconde étape consiste en une double distillation sur un distillateur en quartz (modèle bi-18, Heraeus-Schott, Hanau, Allemagne). La tension superficielle de l'eau à la suite de la distillation mesurée dans le laboratoire par la méthode de la lame de Whilhelmy (Gaines, G. L. (1966)) est supérieure à $71,0 \text{ mN/m}$.

La Rhodamine B utilisée dans les mesures d'épifluorescence provenait de la compagnie J. T Baker Chemical Corp.

2.2 Méthodes

2.2.1 La cuve de Langmuir

Nous présentons à la Fig. 7 un schéma de la cuve de Langmuir que nous avons utilisée pour mesurer les isothermes de pression de surface (Π) - aire résiduelle (A) et potentiel de surface (ΔV) - A.

La cuve (15 x 35 cm) est faite de verre et recouverte de Teflon autoadhésif (Fluorocarbon Dielectrix Division, Lockport, NY). Comme la cuve est recouverte d'un matériel hydrophobe, il est possible de la remplir de telle sorte qu'un ménisque (≈ 2 mm de hauteur) excède le rebord de la cuve. La surface aqueuse est séparée en deux compartiments par le flotteur de mica (1) (13,0 x 0,9 cm) de la balance de Langmuir. L'étanchéité des deux compartiments est assurée en reliant le flotteur aux parois de la cuve au moyen de minces feuilles de Teflon (2) (0,005 x 1,25 x 5 cm). Le compartiment à l'arrière du flotteur, le compartiment de référence (15 x 5 cm) est en tout temps dépourvu de matériel tensioactif. C'est dans ce compartiment que baigne l'électrode de référence utilisée pour les mesures de potentiel de surface (section 2.2.3). Le compartiment compris entre la barrière mobile (3) et le flotteur de la balance de Langmuir est appelé compartiment de travail.

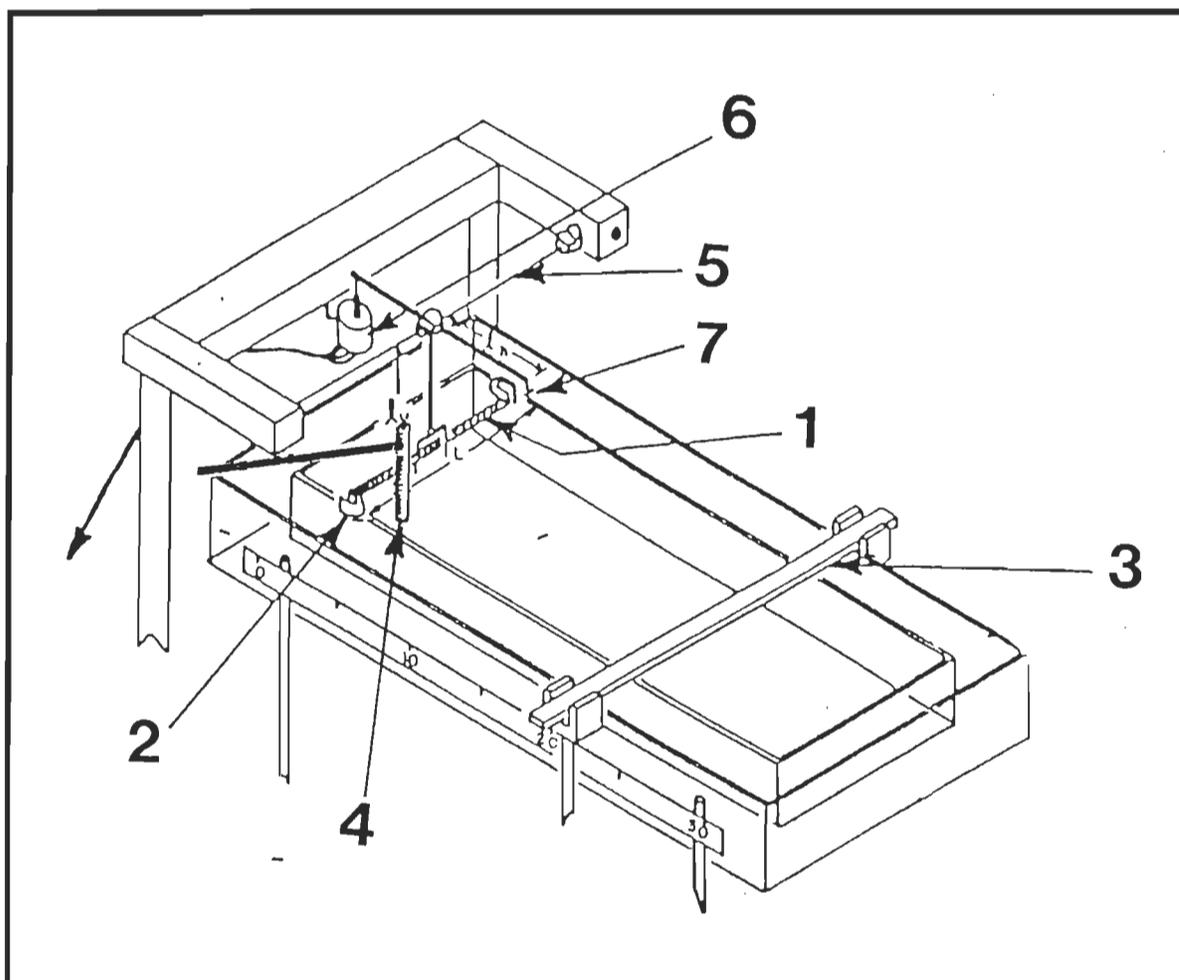


Figure 7. Représentation schématique de la cuve de Langmuir utilisée pour mesurer les isothermes Π -A et ΔV -A. L'identification des différentes composantes apparaît dans le texte.

C'est sur la surface aqueuse de ce compartiment que nous étalons les molécules de polypeptides. C'est aussi au dessus de ce compartiment qu'est placée l'électrode radioactive (4) utilisée pour les mesures de potentiel de surface (section 2.2.3). En déplaçant la barrière mobile, nous diminuons la surface accessible moyenne par molécule ou par résidu étalé à la surface du

compartiment de travail. Cette surface accessible moyenne permet d'introduire la notion d'aire moléculaire ou d'aire résiduelle (A) que l'on définit par la relation:

$$A = S / N \quad (2.1)$$

où S est la surface comprise entre le flotteur de la balance et la barrière mobile. N est le nombre total de résidus (nombre de molécules x le degré de polymérisation) déposés sur la surface de travail. Lorsque S est exprimé en cm^2 et que le nombre de résidus est multiplié par 10^{-16} , l'aire résiduelle obtenue par densimétrie de surface possède des unités de $\text{Å}^2/\text{résidu}$. La diminution d'aire résiduelle est en fait le paramètre le plus commode pour caractériser l'état de compression d'un film polypeptidique lorsque la surface du compartiment de travail est diminuée. L'essentiel de ce travail consistera donc en l'étude des variations de la pression de surface et du potentiel de surface en fonction de l'état de compression des films de polypeptides étudiés. Ces variations seront présentées sous la forme d'isothermes Π -A et ΔV -A (la réduction de l'aire résiduelle s'effectue à température constante) représentées par des graphiques de la pression et du potentiel de surface en fonction de l'aire résiduelle.

2.2.1.1 La pression de surface, Π

La pression de surface représente la variation d'énergie libre par unité de surface causée par la présence d'une couche moléculaire étalée à la

surface de l'eau dans un état de compression donné. La présence d'un film à la surface de l'eau diminue sa tension superficielle γ (unités: mN/m ou mJ/m²). Comme la tension superficielle d'un liquide tend à minimiser la surface de ce dernier, une réduction de la tension superficielle de l'eau résulte en une augmentation de sa surface qui se manifeste par l'affaissement du ménisque. Ainsi, lorsqu'un film est étalé sur la surface de travail cette dernière augmente sa surface et le flotteur séparant la surface de travail et le compartiment de référence se déplace vers ce dernier. Le film exerce donc une pression latérale ou une pression de surface Π . Par définition la pression de surface est donnée par la relation:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.2)$$

où γ_0 est la tension de surface de l'eau pure et γ est la tension de surface lorsque l'eau est recouverte d'un film tensioactif dans un état de compression donné.

2.2.1.2. Mesure de la pression de surface

La pression de surface se manifestant par le déplacement du flotteur vers le compartiment de référence fut mesurée directement à l'aide de la balance de Langmuir (Fig. 7). Comme l'utilisation de cette balance est tout à fait classique nous référons les lecteurs intéressés à son fonctionnement à l'ouvrage de Gaines (Gaines, G. L. (1966)). Nous ajouterons seulement que l'amplitude du déplacement du flotteur relié par le système de levier à un fil

de torsion (5, Fig. 7) est enregistré par un transducteur linéaire de déplacement (6, Fig. 7, modèle 7 DCDT-050, Hewlett-Packard). Ainsi, par une calibration du fil de torsion à l'aide de poids étalonnés, il est possible de mesurer la sensibilité de la balance (en mN/mV) à partir des tensions mesurées (en V) à la sortie du transducteur en fonction de la force exercée (mN) par les poids suspendus au crochet de calibration (7, Fig. 7) par unité de longueur du flotteur (en m). En multipliant la tension lue sur le multimètre par la sensibilité du fil de torsion nous obtenons directement la pression de surface correspondant au déplacement du flotteur en fonction de l'état de compression du film étalé à la surface de l'eau.

Au cours de ce travail nous avons mesuré la pression de surface dans un régime quasi-statique, *i.e.* que la compression et l'expansion des films furent opérées de façon discontinue. Typiquement, l'aire résiduelle fut diminuée ou augmentée par étape de $0,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et nous avons laissé s'équilibrer la pression de surface entre chaque étape. Nous avons opéré de la sorte pour enregistrer des isothermes de compression et d'expansion à l'équilibre thermodynamique et ainsi éviter que ne persistent des gradients de pression latérale dans les films pouvant exister lors d'une compression ou d'une expansion en continue des films d'homopolypeptides hydrophobes (Malcolm, B. R. (1985 a et b)).

La reproductibilité de la mesure de la pression de surface pour les différents états de compression des films étudiés est de l'ordre de ± 2 mN/m.

2.2.2 La formation des films monomoléculaires

Les films monomoléculaires des différents polypeptides étudiés furent étalés à l'interface air-eau à partir des solutions (solvants d'étalement) à l'aide d'une seringue de volume de 100 μ l (Dynatech Precision Sampling Corp., Baton Rouge, LA). Des gouttes de solution furent successivement et soigneusement déposées uniformément sur la surface de travail jusqu'à l'obtention de l'aire résiduelle initiale souhaitée.

Une fois les films formés, une attente d'au moins quinze minutes précédait le début de la compression. Cette attente sert à laisser le temps aux molécules de solvant de s'évaporer. Afin de vérifier qu'il n'existe plus de trace de solvant après 15 minutes et que les solvants ne contenaient pas de substances tensioactives des expériences de contrôle furent effectuées. Dans ces expériences le même volume de solvant (sans les polypeptides) est étalé à l'interface air-eau. Après quinze minutes d'attente, le compartiment de travail est entièrement balayé par la barrière mobile. Aucune trace de tensioactifs (pression de surface) ne fut observée.

Compte tenu des erreurs expérimentales absolues entachant les différentes étapes de préparation des solutions, de la déposition des films à

la surface aqueuse et de l'évaluation de la surface de travail, nous estimons la précision sur les valeurs d'aires résiduelles obtenues par densimétrie de surface à $\pm 0,3 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$.

2.2.3 Le potentiel de surface, ΔV

2.2.3.1 Les origines du potentiel de surface: que mesure-t-on ?

Il existe de part et d'autre de la surface aqueuse une différence de potentiel électrique originant de la ségrégation de charges négatives et positives à la surface de l'eau. Cette ségrégation de charges résulte en partie de la présence d'un excès de dipôles de molécules d'eau orientées perpendiculairement au plan de la surface. De plus, si la phase aqueuse contient des ions et que ces derniers s'adsorbent à la surface, une double couche ionique diffuse peut s'y établir et ainsi ajouter à la différence de potentiel électrique de part et d'autre de l'interface.

Conceptuellement, le potentiel électrique interne ou potentiel de Galvani (φ) de la phase aqueuse peut être séparé en deux contributions (Bockris et Reddy (1977) et Aveyard et Haydon (1973)):

$$\varphi = \psi + \chi \quad (2.3)$$

où ψ est le potentiel électrique externe de la phase aqueuse dû à la présence de charges électrostatiques (ions et extrémités des dipôles) à sa surface et χ est la différence de potentiel entre la surface (où le potentiel est ψ) et l'intérieur de la phase aqueuse où le potentiel est ϕ . χ est appelé potentiel de surface ou potentiel dipolaire et est causé par la ségrégation de charges positives et négatives à la surface. C'est à ce potentiel que nous nous intéressons ou plutôt à sa variation causée par la présence d'un film à l'interface et ce en fonction de l'état de compression de ce dernier. Cependant, nous n'avons qu'indirectement accès à la variation de χ . En effet χ et $\Delta\chi$ ne sont pas des quantités mesurables expérimentalement (Bockris et Reddy (1977) et Aveyard et Haydon (1973)). Par contre, la variation du potentiel externe ou la différence de potentiel de Volta ($\Delta\psi$) de la surface aqueuse est mesurable expérimentalement. Ainsi, comme la variation du potentiel externe de la phase aqueuse peut être attribuée à une variation du potentiel χ , la mesure de la différence de potentiel de Volta peut nous renseigner indirectement sur la variation du potentiel χ causée par la présence d'un film à la surface.

2.2.3.2 La mesure du potentiel de surface, ΔV

La différence de potentiel de Volta causée par le film peut être mesurée par la méthode de l'électrode radioactive (Gaines, G. L. (1966), Bockris et Reddy (1977) et Aveyard et Haydon (1973)). Dans cette méthode, une électrode radioactive de ^{241}Am (Nuclear Radiation Development, Grand Island, NY) est placée à une distance d'environ 3 mm

de la surface aqueuse. Par ionisation de l'air, l'électrode radioactive permet d'établir le contact électrique avec la surface de la phase aqueuse. L'électrode radioactive est branchée à un amplificateur opérationnel (modèle AD311K, Analog Device, Norwood, MA) à impédance d'entrée élevée ($10^{14} \Omega$) monté dans le mode suiveur de tension avec gain fixe. Le potentiel de l'électrode radioactive est mesuré à l'aide d'un multimètre branché aux bornes de sortie de l'amplificateur par rapport à une électrode de référence de platine (modèle p101, Radiometer electrodes, Copenhague, Danemark) mise à la terre (commune) et baignant dans le compartiment de référence (Fig. 7). La cuve est placée dans une cage de Faraday afin d'éliminer les interférences des champs électromagnétiques environnants.

Alors dans un premier temps nous mesurons la différence de potentiel pour l'interface propre (ΔV_0). Cette différence de potentiel est communément appelée potentiel initial. Lorsqu'un film insoluble est étalé à la surface de l'eau, le potentiel initial est changé. Ce nouveau potentiel en présence du film et en fonction de l'état de compression est appelé ΔV_f . En soustrayant le potentiel initial du potentiel en présence du film, nous obtenons ainsi la variation du potentiel de Volta (ΔV) généré par la modification du potentiel χ à la surface.

$$\Delta V_f - \Delta V_0 = \Delta V = \Delta \chi \quad (2.4)$$

La reproductibilité des valeurs de ΔV que nous mesurons avec ce montage est de l'ordre de ± 20 mV.

2.2.3.3 Interprétation des valeurs de ΔV mesurées

La variation du potentiel de surface peut provenir à la fois de la réorientation des molécules d'eau et de la réorganisation de la double-couche ionique si le film étalé est ionisé. De plus, si les molécules du film possèdent un moment dipolaire permanent, une contribution de ces derniers s'ajoutera au ΔV enregistré. Nous pouvons donc constater que les contributions au ΔV sont multiples. Nous verrons que cela complique d'autant l'interprétation des valeurs de ΔV enregistrées.

Si l'on néglige la présence de la double couche ionique diffuse, la contribution au potentiel de surface χ initial des dipôles des molécules d'eau à la surface peut se modéliser par analogie avec un condensateur plan. En effet, théoriquement, la différence de potentiel causée par un réseau de dipôles permanents et orientés selon la normale du plan de la surface est électriquement analogue à la différence de potentiel entre les deux plaques d'un condensateur plan.

La différence de potentiel (V en mV) entre les plaques d'un condensateur plan est donnée par la relation 2.5 où N est le nombre de charges élémentaires (e) par cm^2 , d la distance entre les plaques du condensateur et ϵ est la constante diélectrique du milieu entre les deux plaques.

$$V = 4\pi Nde/\epsilon \quad (2.5)$$

Comme $d \times e$ est en fait un moment dipolaire, nous pouvons réécrire la relation 2.5 sous la forme:

$$\chi = 4\pi N\mu_{\perp}/\epsilon \quad (2.6)$$

Ainsi, la différence de potentiel (en mV) causée par la présence de dipôles de molécules d'eau à l'interface peut être approximée par la relation 2.6 où μ_{\perp} représente la projection des moments dipolaires permanents des molécules d'eau sur l'axe perpendiculaire au plan de la surface et N représente le nombre de dipôles par cm^2 . Lorsqu'un film est déposé à la surface, la variation de χ et $\Delta V_f - \Delta V_0$ peut être approximée par:

$$\Delta V = \Delta V_f - \Delta V_0 = \Delta\chi = 4\pi \Delta(N\mu_{\perp})/\epsilon \quad (2.7)$$

Ainsi pour le cas où les molécules constituant le film n'ont pas de moment dipolaire permanent, ΔV peut être approximé par une réorientation des molécules d'eau par les molécules du film et une variation de leur densité surfacique. Cependant la modélisation fine du ΔV est difficile. En effet, la modélisation fine nécessiterait la connaissance de l'orientation privilégiée des molécules d'eau réorientées et de la constante diélectrique à l'interface. Ces deux quantités sont difficilement déterminables. Ainsi, il est généralement accepté dans la littérature de considérer la constante

diélectrique à 1 et de laisser tomber le Δ (Gaines, G. L. (1966)). Si on exprime la densité de dipôles réorientés en fonction de l'aire moléculaire ou l'aire résiduelle (A), l'expression 2.7 devient donc (Gaines, G. L. (1966)):

$$\Delta V = 4\pi \mu_{\perp}/A \quad (2.8)$$

Cette relation sous-entend que μ_{\perp} (relation 2.9, en mD) est le moment dipolaire résultant de la réorientation des molécules d'eau lorsque les molécules du film ne possèdent pas de moment dipolaire permanent.

$$\mu_{\perp} = \Delta V A/12\pi \quad (2.9)$$

Cette analogie du condensateur plan possède d'autres faiblesses. En effet, comme la variation du potentiel de surface χ est évaluée à partir de la variation du potentiel ψ à la surface de l'eau, les molécules du film placées juste au-dessus de la surface pourraient contribuer à diminuer le potentiel électrostatique réel existant à la surface. En effet, le champ électrique associé aux charges situées à la surface de l'eau pourrait induire un contre-champ (champ électrique de sens inverse) par l'induction de moment dipolaire (polarisation) dans les molécules du film agissant ainsi comme un matériau diélectrique à la surface d'une plaque d'un condensateur (Bockris et Reddy (1977)).

Ainsi donc, en résumé, la variation du potentiel de surface $\Delta\chi$ causée par l'étalement d'un film ne possédant pas de moment dipolaire permanent sur une surface d'eau pure est au mieux proportionnelle à la différence $\Delta V_f - \Delta V_0$.

Si les molécules constituant le film déposé à la surface possèdent des dipôles permanents, la contribution de ces derniers doit s'ajouter à la contribution de la réorientation des molécules d'eau (Aveyard et Haydon (1973)). D'un autre côté, la détermination de la grandeur et de l'orientation précises du moment dipolaire des molécules nécessite une modélisation fine qui peut s'avérer difficile pour les cas des macromolécules. Par contre, même si la grandeur et l'orientation du moment dipolaire des molécules du film sont connues, la détermination de la contribution exacte de ce moment dipolaire au ΔV mesuré est toujours entachée par l'incertitude de la constante diélectrique du milieu dans lequel se trouve ce moment dipolaire.

Pour des films ionisés étalés à la surface d'une phase aqueuse contenant des ions une contribution supplémentaire au ΔV , ψ_0 , associée à la réorganisation de la double couche ionique diffuse doit être considérée. Le traitement théorique de la variation de potentiel de surface causée par la réorganisation de la double couche ionique diffuse est fournie par la théorie de Gouy-Chapman. Ce traitement ne sera pas discuté car les molécules étudiées dans ce présent travail ne sont pas chargées et la sous-phase utilisée

est de l'eau pure. Nous référons quand même les lecteurs intéressés à consulter la thèse de Marc Brullemans (Brullemans, M. (1992)).

Il appert donc que du point de vue quantitatif, les mesures de ΔV peuvent difficilement nous renseigner sur les origines moléculaires exactes de la variation du potentiel de surface causée par la présence d'un film. Cependant, d'un point de vue qualitatif la variation de ΔV en fonction de l'état de compression du film (aire résiduelle) peut s'avérer une source d'information importante en ce qui concerne l'organisation des films à l'interface.

2.2.4 Analyse conformationnelle de polypeptides par spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge de polypeptides et de protéines contient plusieurs bandes d'absorption relativement fortes qui sont associées à différents modes de vibration de la liaison peptidique (CONH) appelées bandes amides. Parmi ces bandes, il en existe une de forte intensité et qui est sensible à la conformation dans laquelle se trouve la liaison peptidique. C'est la bande Amide I. Le mode de vibration de cette bande est composé essentiellement (80 %) de l'étirement de la liaison carbonyle CO (Arrondo *et al.* (1993)). Ainsi, la fréquence de vibration de la liaison CO et, par conséquent, la position sur le spectre de la bande Amide I dépend de la géométrie des liaisons-H des structures secondaires dans lesquelles se trouvent les CO.

Pour un polypeptide organisé en hélice- α , la fréquence de la bande Amide I est typiquement située entre 1650 et 1658 cm^{-1} (Krimm et Bandekar (1986)) tandis que pour une organisation en feuillet- β , elle est typiquement comprise entre 1624 cm^{-1} et 1632 cm^{-1} (*ibid*). De plus, pour le feuillet- β antiparallèle il y a une bande supplémentaire centrée vers à 1690 cm^{-1} causée par l'éclatement caractéristique de la bande Amide I causée par un couplage des dipôles des transitions vibrationnelles exclusif pour l'arrangement antiparallèle des brins- β (Krimm et Bandekar (1986)). Cette bande caractéristique du feuillet- β antiparallèle est environ dix fois moins intense que la bande située vers 1630 cm^{-1} (Arrondo *et al.* (1993)).

La situation est plus complexe pour la bande Amide I des boucles- β . Comme les boucles peuvent être de plusieurs types et qu'elles sont composées de quatre résidus qui ont leur propre mode de vibration, il est difficile de spécifier sur les spectres le type de boucle présent. En effet certaines des positions prédites pour les différents résidus dans les boucles chevauchent les positions caractéristiques pour le feuillet- β antiparallèle ($\approx 1690 \text{ cm}^{-1}$) et l'hélice- α ($\approx 1655 \text{ cm}^{-1}$) (Krimm et Bandekar (1986)). Ainsi la présence de boucles- β dans un spectre infra-rouge d'un polypeptide ou d'une protéine est généralement attribuée à l'observation d'une bande vers 1670 cm^{-1} prédite pour tous les types de boucles ((Krimm et Bandekar (1986)) et où l'hélice- α et le feuillet- β n'absorbent généralement pas. Le Tableau 3 donne un résumé des positions de la bande Amide I en fonction de la structure secondaire.

Tableau 3
Position de la bande Amide I des polypeptides sur un spectre infrarouge en fonction de la structure secondaire

Structure secondaire	Position de la bande Amide I (en cm^{-1})
Hélice- α	1650-1658
Feuillet- β antiparallèle	1624-1632, \approx 1690
Feuillet- β parallèle	1624-1632
Boucles- β	\approx 1670

Comme les protéines et les polypeptides sont normalement constitués d'un mélange de structures secondaires, la région de la bande Amide I de leurs spectres infra-rouge est en fait une bande composite où les bandes caractéristiques des différentes structures secondaires se chevauchent. Par contre, une estimation de la proportion des structures secondaires d'une protéine ou d'un polypeptide peut s'effectuer par simulation spectrale de la région de la bande Amide I (Arrondo *et al.* (1993) et Surewicz et Mantsch (1988)). Les paramètres nécessaires à une telle simulation sont le nombre d'espèces contribuant au spectre composite (le nombre de bandes), leurs fréquences caractéristiques, l'intensité et la largeur de la bande à la mi-hauteur. Ces paramètres sont fournis à un programme de simulation spectrale qui minimise de façon itérative la différence entre le spectre original et l'enveloppe résultant de la somme des bandes possédant les paramètres spécifiés. L'intensité intégrée de chaque composante est directement reliée à la proportion de chacune des structures secondaires

(Arrondo *et al.* (1993) et Surewicz et Mantsch (1988)). Cependant nous devons faire l'hypothèse que l'absorptivité intrinsèque de chaque espèce est identique pour que les intensités intégrées soient directement proportionnelles à la quantité de chaque structure secondaire. En dépit du fait que cette hypothèse demeure invérifiée (Surewicz et Mantsch (1986), les pourcentages de structures secondaires pour des protéines dont la structure complète est déjà connue et ceux estimés par ce type d'analyse conformationnelle sont généralement en bon accord (Surewicz et Mantsch (1986) et Arrondo *et al.* (1993)). Cependant les pourcentages de structures secondaires déterminés à partir des intensités intégrées doivent quand même être considérés comme des valeurs approximatives (Surewicz et Mantsch (1986) et Arrondo *et al.* (1993)).

Comme nous le verrons les spectres infrarouges de la PLA et de la PLL que nous avons enregistrés par FTIR-MIR sont des spectres composites. Nous avons donc estimé le pourcentage des différentes conformations possiblement présentes selon l'approche que nous venons de présenter. Le programme de simulation spectrale que nous avons utilisé fut Grams 386 (Galactic Industries Corp. Salem, NH).

Il existe différentes méthodes d'échantillonnage pour enregistrer les spectres infrarouges de protéines et de polypeptides (Arrondo *et al.* (1993)). Parmi ces méthodes d'échantillonnage, il y a la méthode par réflexions internes multiples (MIR, Fig. 8), (Harrick, N.J. (1967)) qui se prête bien à

l'échantillonnage de spectres infrarouges de films de polypeptides en films Langmuir-Blodgett (section suivante).

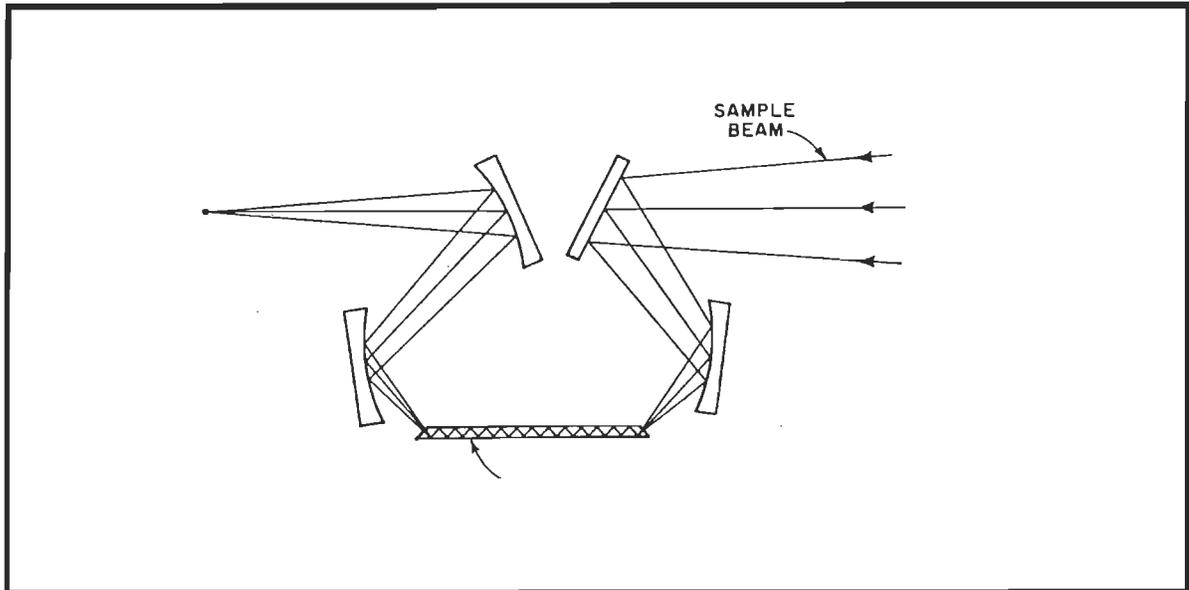


Figure 8. Représentation schématique d'un dispositif à miroir utilisé pour l'échantillonnage d'un spectre FTIR-MIR. La flèche indique le cristal de Ge à la surface duquel les polypeptides sont déposés. Tiré de Harrick, N. J. (1967).

Cette technique consiste à déposer les films de polypeptides directement sur un matériau d'indice de réfraction élevé et transparent à la lumière infrarouge. Le matériau que nous avons utilisé fut le Germanium (Ge) taillé sous la forme d'un trapèze à 45° . À l'aide d'un dispositif de miroirs, le faisceau de lumière infra-rouge est focalisé sur une des faces du cristal (Fig. 8). La lumière incidente peut ainsi être réfléchiée en de multiples points sur les surfaces internes du cristal. À chaque point de réflexion une partie de la lumière sort du cristal (l'onde évanescente, (Harrick, N.J. (1967))) et peut donc être absorbée par le film déposé à sa surface externe. La lumière

infra-rouge sortant du cristal est focalisée à l'aide du dispositif de miroirs vers le détecteur du spectrophotomètre et un spectre infra-rouge de la substance à la surface du cristal peut ainsi être mesuré.

2.2.4.1 Fabrication des films Langmuir-Blodgett

Les films de polypeptide furent déposés directement sur les cristaux de Ge (50 x 20 x 2 mm, Wilmad, Buena, NJ), préalablement nettoyés dans un four à plasma (modèle Plasmod, Tegal Corp, Novato, CA), par la technique de Langmuir-Blodgett (Blodgett, K. B. (1935)). Les films de polypeptide sont transférés seulement lorsque que la lame sort de la sous-phase. Typiquement, des rapports de déposition supérieurs à 0,93 furent obtenus. Le rapport de déposition est en fait le rapport entre la surface totale de la lame immergée dans la sous-phase et la surface balayée par la barrière mobile pour que la pression de surface reste constante pendant que le film est transféré. Un rapport de déposition de 1 signifie que la surface occupée par les films sur le substrat solide est identique à la surface qu'ils occupent à l'interface. Ainsi, d'après les rapports de déposition que nous avons obtenus, il apparaît que l'organisation des films transférés sur les cristaux de Ge devrait être tout à fait représentative de leur organisation à l'interface.

2.2.4.2 Enregistrement des spectres FTIR-MIR

Immédiatement après leur formation, les films Langmuir-Blodgett furent installés dans l'enceinte du spectrophotomètre infra-rouge (modèle

IFS 66, de la compagnie Bruker, Boston, MA) munie d'un dispositif MIR (Harrick Scientific Corp., Ossining, NY). Avant l'enregistrement des spectres, l'enceinte du spectrophotomètre est scellé et un jet d'azote anhydre perfuse cette dernière pour chasser les vapeurs d'eau indésirables pendant au moins une heure. Les spectres FTIR des films sont mesurés contre le spectre de la lame propre (nettoyée dans un four à plasma) par l'accumulation de 2 000 interférogrammes sous un jet d'azote permanent. Les spectres ainsi obtenus sont à toutes fins pratiques exempts des fines bandes d'absorption intenses attribuables à la vapeur d'eau. La résolution de l'appareil était de 1 cm^{-1} . Lorsque que ce fut nécessaire, une correction de la ligne de base (extrapolation linéaire) fut effectuée en utilisant le programme fourni par la compagnie Bruker.

2.2.5 Visualisation des agrégats de PBLG aux grandes aires résiduelles par microcopie à épifluorescence directement à l'interface air-eau

Le schéma du microscope à épifluorescence monté sur une cuve de Langmuir est présenté à la Fig. 9. Pour une description détaillée et le fonctionnement d'un microscope à épifluorescence nous référons le lecteur intéressé à l'article de Grainger et collaborateurs (Grainger *et al.* (1989)).

Afin de visualiser les agrégats de PBLG aux grandes aires résiduelles, nous avons procédé de la façon suivante. Une fois le film étalé, une solution de

Rhodamine B, un fluorophore, fut injectée dans la sous-phase d'eau pure à une concentration finale de 100 nM.

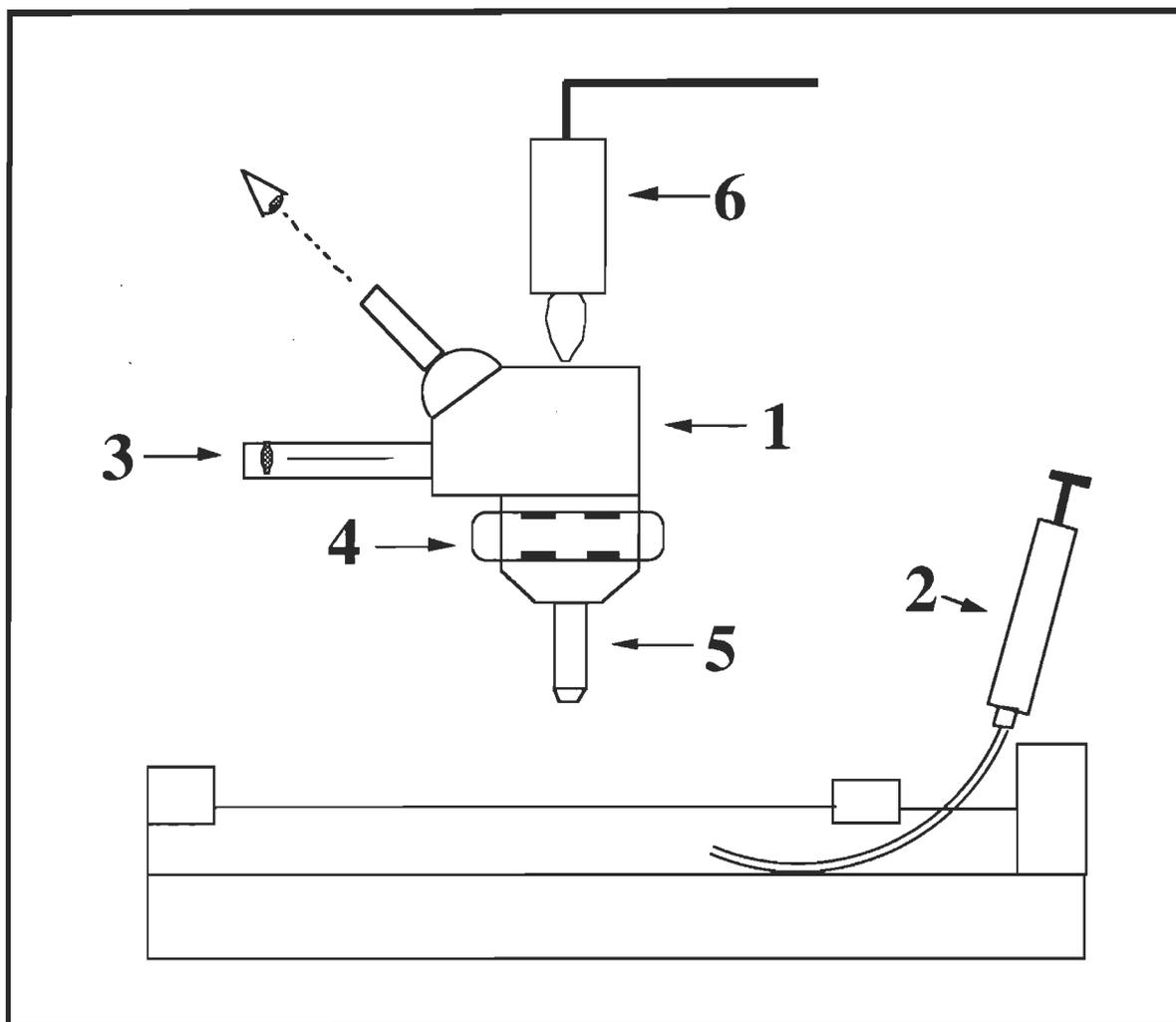


Figure 9 Schéma d'une cuve de Langmuir sur laquelle est monté un microscope à épifluorescence (1): 2-injection de la Rhodamine B, 3-source lumineuse, 4-filtres interférentiels, 5-objectif et 6-caméra vidéo. Tiré et adapté de Grainger *et al.* (1989).

La visualisation du film fut faite une heure après l'injection afin de permettre une distribution uniforme de la Rhodamine dans la sous-phase et

l'interface. La Rhodamine située près de l'interface est excitée au moyen d'une lampe au mercure. La fluorescence de la Rhodamine est séparée de la lumière d'excitation grâce à un miroir dichroïque et un système de filtres interférentiels. La fluorescence de la Rhodamine est ensuite focalisée par l'optique du microscope vers une caméra vidéo. Il fut ainsi possible de visualiser les agrégats de PBLG par une adsorption préférentielle (plus grande luminosité) de la Rhodamine sur la surface propre autour des agrégats (Lavigne *et al.* (1994)).

CHAPITRE 3

L'ORGANISATION DU POLY- γ -BENZYL-L-GLUTAMATE À L'INTERFACE AIR-EAU SOUS SA CONFORMATION α -HELICOÏDALE

La structure moléculaire d'un résidu benzyle glutamate est présentée à la Fig. 14. Les isothermes Π -A et ΔV -A du PBLG sous sa conformation α -hélicoïdale sont caractérisées depuis déjà plusieurs années (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). De plus, on peut retrouver dans la littérature certaines données concernant son organisation à l'interface air-eau de même que des spectres IR-MIR sous sa conformation α -hélicoïdale (Tanateka *et al.* (1980)). Il s'agit donc d'un bon point de départ pour mettre à l'épreuve notre méthodologie pour l'enregistrement des isothermes Π -A, ΔV -A et des spectres FTIR-MIR de polypeptides de même que pour vérifier la justesse du modèle que nous utilisons pour calculer les aires résiduelles d'homopolypeptides hydrophobes organisés en hélice- α . Nous verrons cependant que certains aspects concernant l'organisation du PBLG et les isothermes ΔV -A émanants des études antérieures sont discutables ou moins bien caractérisés. Nous présenterons dans les prochains paragraphes un

résumé des propriétés interfaciales du PBLG sous sa conformation α -hélicoïdale et des données concernant son organisation connues à ce jour de même que les points sur lesquels nous apportons de nouvelles interprétations ou une meilleure caractérisation.

Malcolm fait état de l'existence d'une conformation α -hélicoïdale du PBLG à l'interface air-eau lorsque celui-ci y est étalé en solution dans le chloroforme ou le dichloro-méthane (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). Les spectres IR-MIR (Tanateka *et al.* (1980)) de multicouches de PBLG formées par la déposition successive de monocouches sur un cristal de Germanium (Ge) et les patrons de diffraction des électrons de multicouches de PBLG formées par l'affaissement (collapse) du film monomoléculaire (Malcolm, B. R. (1968)) sont caractéristiques d'une organisation en hélice- α du PBLG à l'interface air-eau. En effet, la position de la bande Amide I (1654 cm^{-1}) sur le spectre IR-MIR de multicouches de PBLG obtenu par Tanateka et collaborateurs est caractéristique d'une organisation en hélice- α à l'interface air-eau. Aussi, Malcolm a observé sur les patrons de diffraction des électrons de multicouches de PBLG l'existence de la réflexion méridionale correspondant à la translation de $1,5\text{ \AA}$ /résidu caractéristique l'hélice- α et la présence d'une réflexion équatoriale correspondant à un espacement régulier de $14,3\text{ \AA}$ entre les axes des hélices dans les multicouches (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). En tenant compte de l'orientation relative du faisceau d'électrons par rapport à l'orientation des films multimoléculaires Malcolm a aussi montré que les axes des hélices sont

alignés parallèlement à la barrière mobile et à la surface (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). Malcolm associe à la distance de 14,3 Å qu'il a observée une organisation interdigitée des hélices- α de PBLG dans les multicouches et propose que cette situation prévaut pour l'entassement limite du film monomoléculaire à l'interface air-eau.

Nous verrons que la pertinence d'une interdigitation des chaînes latérales pour l'entassement limites des hélices- α de PBLG telle que proposée par Malcolm est discutable. Nous proposons à l'aide de notre modèle une autre organisation des chaînes latérales des hélices- α de PBLG qui nous apparaît plus vraisemblable.

L'isotherme Π -A du PBLG tout comme celle d'autres homopolypeptides hydrophobes avec de longues chaînes latérales présente un plateau de pression de surface caractéristique (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). De façon générale, la présence d'un plateau sur une isotherme Π -A indique l'existence d'une transition de phase d'ordre premier (Harkins, D. H. (1952)). L'existence d'une telle discontinuité sur une isotherme Π -A résulte du fait que la phase vers laquelle le film monomoléculaire se transforme est en équilibre et est immiscible avec la phase originale. En effet, selon la règle des phases de Crisp (Gaines, G. L. (1966)), qui est en fait une extension en deux dimensions de la règle des phases de Gibbs, la présence d'une phase additionnelle à l'interface air-eau résulte en la perte d'un degré de liberté pour décrire le système et une discontinuité de l'aire

résiduelle doit être observée sur l'isotherme Π -A durant une transition de phase d'ordre premier.

Sur la base de l'absence d'un changement conformationnel des homopolypeptides hydrophobes à longues chaînes latérales comme le PBLG organisés en hélices- α durant cette transition, Malcolm y attribua une transition d'un état monomoléculaire vers une organisation bimoléculaire des films d'homopolypeptides hydrophobes organisés en hélice- α (Malcolm, B. R. (1968) et (1973)). De façon plus tangible, l'existence d'une telle transition a été démontrée par des études en ellipsométrie. L'ellipsométrie est une méthode optique non destructrice qui est sensible à l'épaisseur de films minces étalés à l'interface air-eau (Ducharme, D. (1987)). À l'aide de cette technique, Motschmann et collaborateurs (Motschmann *et al.* (1991)) ont montré que l'épaisseur d'un film d'homopolypeptide hydrophobe à longue chaîne latérale similaire au PBLG et organisé en hélice- α est deux fois plus épais à la fin de la transition qu'au début. De plus, Malcolm a montré que la formation de la bicouche pour de tels homopolypeptides hydrophobes débute près de la barrière mobile où la pression de surface est probablement plus élevée que celle existant à l'autre extrémité de la surface (Malcolm, B. R. (1985 a et b)). Une fois la transition initiée, la bicouche couvre graduellement la surface (Malcolm, B. R. (1985 a et b)). Il semble donc exister une réelle séparation de phase durant la transition monocouche-bicouche pour des homopolypeptides hydrophobes à longues chaînes

latérales et organisés en hélice- α expliquant ainsi l'horizontalité de l'isotherme Π -A dans cette région.

Les isothermes ΔV -A de films d'homopolypeptides hydrophobes avec de longues chaînes latérales et organisés en hélices- α présentent des plateaux débutant au même endroit où débutent les transitions monocouche-bicouche. L'existence de ce plateau sur l'isotherme ΔV -A du PBLG est assez bien caractérisée dans la littérature. Cependant le comportement du potentiel de surface juste avant la transition monocouche-bicouche (durant la montée de Π) l'est moins. De plus, on observe une grande variabilité du potentiel de surface pour des films de PBLG à des valeurs de A plus grandes que la valeur où une pression de surface significative peut être mesurée (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). Afin d'expliquer cette variabilité, Malcolm propose l'existence d'inhomogénéités dans les films de PBLG pour ces grandes valeurs de A.

À l'aide de la technique de microscopie à épifluorescence directement à l'interface air-eau nous avons visualisé (à notre connaissance pour la première fois) ces inhomogénéités qui se manifestent en fait sous la forme d'agrégats incompressibles. Les molécules de PBLG ont donc la propriété de s'auto-organiser. À partir de l'organisation en agrégats incompressibles du PBLG et de l'analyse de la variation du moment dipolaire perpendiculaire (μ_{\perp}), il est possible de rationaliser le comportement du potentiel de surface juste avant la transition monocouche-bicouche (montée

de Π). Nous discutons aussi du phénomène d'auto-organisation du PBLG en relation avec le nouvel arrangement des chaînes latérales que nous proposons.

Ainsi, les points sur lesquels nous apportons de nouvelles interprétations et une meilleure caractérisation concernent l'organisation du PBLG aux valeurs de A supérieures à celle correspondant au début de la transition monocouche-bicouche observée sur son isotherme Π - A .

3.1 L'isotherme Π - A du PBLG et l'étude de sa conformation à l'interface air-eau par FTIR-MIR

3.1.1 L'isotherme Π - A du PBLG

Nous présentons à la Fig. 10 l'isotherme Π - A que nous avons obtenue pour le PBLG lorsqu'étalé à l'interface en solution dans le chloroforme.

Nous pouvons remarquer la présence, sur l'isotherme Π - A du PBLG, du plateau de pression de surface caractéristique de la transition monocouche-bicouche pour ce type d'homopolypeptide hydrophobe organisé en hélice- α . Le point de décollement de Π situé vers $22,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ de même que le point marquant le début la transition monocouche-bicouche situé vers $19,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ correspondent bien avec ceux rapportés par Malcolm pour des conditions expérimentales semblables aux nôtres (Malcolm, B. R. (1968)). Il en est de même pour la valeur du

plateau de Π de 8 mN/m et la fin apparente plus ou moins bien définie de la transition observée vers 11,0 Å²/résidu.

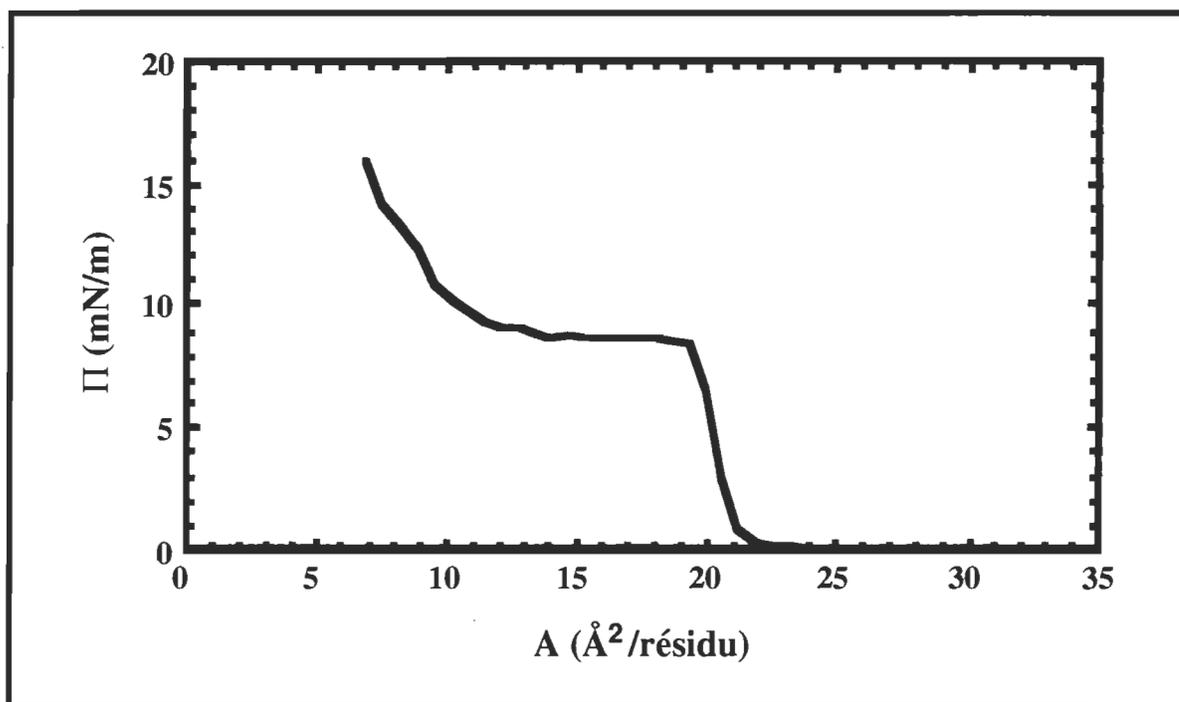


Figure 10. Isotherme de pression de surface (Π)-aire résiduelle (A) obtenue pour le PBLG étalé à l'interface air-eau bidistillée en utilisant le chloroforme comme solvant d'étalement. $T=20 \pm 2^\circ\text{C}$. Degré de polymérisation = 105.

Concernant ce dernier point, si la transition monocouche-bicouche était un processus purement d'ordre premier, la fin de la transition devrait être caractérisée par un changement brusque de la pente de la courbe Π - A plutôt qu'une région arrondie de l'isotherme telle qu'observée (Denicourt, N. (1990) et les références qui y sont citées). Ainsi, théoriquement, comme la fin de la transition devrait indiquer l'endroit sur l'isotherme Π - A où une organisation purement bimoléculaire du PBLG existe à l'interface, ce

changement brusque de la pente aurait dû être observé vers une aire résiduelle correspondant à la moitié de celle du début de la transition soit vers $10,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ ($19,5/2 \text{ (\AA}^2/\text{résidu})$). Il apparaît donc que la transition monocouche-bicouche du PBLG ne soit pas purement d'ordre premier. D'un autre côté, en raison d'un positionnement de l'électrode radioactive près du flotteur de la balance de Langmuir, l'isotherme ΔV -A du PBLG présente dans la région arrondie de l'isotherme Π -A une chute de ΔV bien définie qui peut être attribuée à l'existence d'une bicouche complète à l'interface (section 3.3). Ainsi, cette chute de ΔV nous permet de proposer avec plus de précision l'aire résiduelle correspondant à la fin de la transition monocouche-bicouche du PBLG .

3.1.2 Mesures en infrarouge

Nous présentons à la Fig. 11 la région des bandes Amides I et II du spectre FTIR-MIR que nous avons enregistré pour une monocouche Langmuir-Blodgett transférée au début de la transition ($\Pi = 8 \text{ mN/m}$). La bande Amide I, située à 1654 cm^{-1} , est caractéristique d'une organisation en hélice- α (Krimm et Bandekar (1986)). Cette valeur correspond à la position rapportée par Tanateka et collaborateurs (Tanateka *et al.* (1980). Il en va de même pour le reste de la région spectrale présenté à la Fig. 11 (bande Amide II (1545 cm^{-1}) et la bande centrée vers 1735 cm^{-1} que ces auteurs attribuent à la fréquence de l'étirement du carbonyle de la chaîne latérale. De plus, la bande Amide I ne montre pas d'épaulement apparent, ce qui

suggère une organisation à 100% en hélice- α du PBLG à l'interface air-eau au début de la transition.

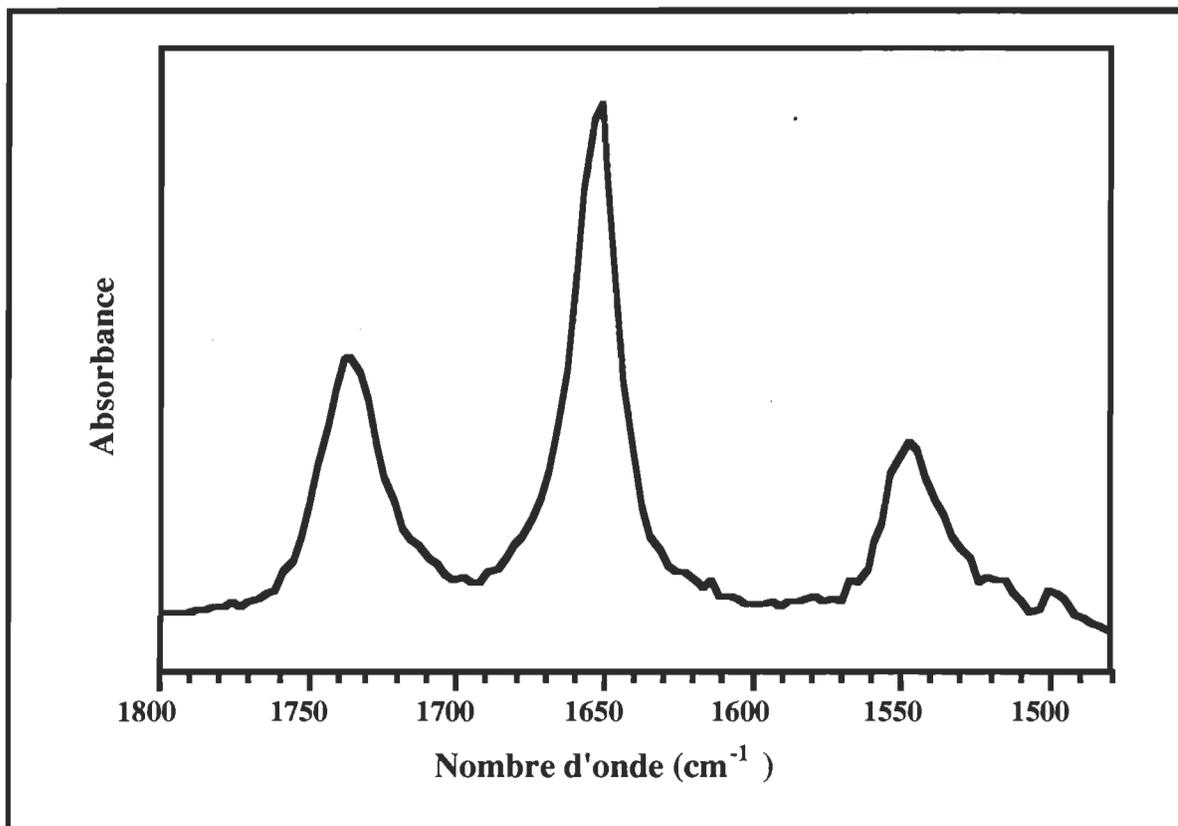


Figure 11. Région des bandes Amides I et II du spectre FTIR-MIR d'une monocouche Langmuir-Blodgett de PBLG transférée sur un cristal de Ge au début de la transition monocouche-bicouche ($\Pi = 8$ mN/m). Les détails techniques sont présentés au chapitre 2.

Nous avons aussi enregistré le spectre FTIR-MIR d'un film Langmuir-Blodgett déposé vers la fin de la transition ($11,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$). Aucune modification du spectre n'a été observée si ce n'est que l'absorbance est passée à peu près du simple au double. Cette observation vient confirmer le

fait que la transition de phase observée correspond bel et bien à une transition monocouche-bicouche et elle vient aussi écarter tout doute d'un changement de conformation durant cette transition. Tanateka et ses collaborateurs rapportent également que l'intensité des bandes passe du simple au double lorsque les films Langmuir-Blodgett sont formés à la fin de la transition.

3.2 Organisation du PBLG au début de la transition monocouche-bicouche

Afin de préciser l'entassement (packing) des hélices de PBLG au début de la transition monocouche-bicouche à $19,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ nous avons développé un modèle permettant de déterminer la distance entre des hélices parallèles (et l'aire résiduelle correspondante) et ce, pour différentes conformations des chaînes latérales et différents types d'interactions entre les hélices.

L'espacement entre les axes des hélices de $14,3 \text{ \AA}$ déterminé par Malcom (Malcolm, B. R. (1968)) dans les films affaissés (collapsés) fut considéré par ce dernier comme la distance inter-hélices limite pour une organisation monomoléculaire. D'un autre côté, l'espacement limite entre des hélices- α de PBLG devrait correspondre à l'espacement retrouvé au début de la transition monocouche-bicouche. En effet, si le film commence à prendre une organisation tridimensionnelle à cet endroit, cela implique que l'entassement des hélices- α de PBLG a atteint une limite. Compte tenu

du modèle que nous présentons, nous serons en mesure de comparer cette valeur expérimentale avec les valeurs calculées avec notre modèle.

3.2.1 Présentation du modèle utilisé pour calculer la distance entre les axes des hélices- α et l'aire résiduelle correspondante

Pour déterminer la distance entre les axes de deux hélices- α , nous avons besoin principalement de deux paramètres *i.e.* le rayon interne effectif (r_i) de l'hélice- α et le rayon externe effectif (r_e) de l'hélice- α considérée.

Le rayon interne effectif (r_i) est défini comme étant la plus petite distance à laquelle un atome d'une hélice- α peut s'approcher de l'axe d'une autre hélice (Fig. 12). Cette distance est donnée par la distance de l'atome placé le plus près de l'axe de l'hélice auquel on ajoute la valeur de son rayon de van der Waals. Il s'agit en fait d'une distance effective (d_{eff}). Les valeurs de rayons de van der Waals que nous utilisons (Tableau 4) furent déterminées à partir des distances inter-atomiques pour lesquelles l'énergie potentielle d'interaction de van der Waals est optimale (Chou *et al.* (1983)). Ces valeurs sont de 0,15 à 0,30 Å plus élevées que les valeurs classiques de rayons de van der Waals (Creighton, T. E. (1993)). Nous présentons au Tableau 4 les différentes valeurs de distances entre l'axe d'une hélice- α et les atomes constituant le squelette polypeptidique ainsi que les valeurs de

distances effectives correspondantes. On peut voir sur ce tableau que r_i pour une hélice- α vaut 2,9 Å.

Tableau 4
Distances (en Å) séparant les différents atomes du
squelette polypeptidique de l'axe d'une hélice- α (d_i),
valeurs des rayons de van der Waals (r_{vdW}) de ces atomes
et distances effectives (d_{eff}) correspondantes.

Atome	d_i^1	r_{vdW}^2	d_{eff}
N	1,55	1,99	3,54
H	1,54	1,34	2,88
C α	2,29	2,06	4,35
H α	3,01	1,46	4,47
C	1,66	1,87	3,53
O	1,91	1,56	3,47

¹ Tirés de Arnott et Dover (1967).

² Tirés de Chou *et al.* (1983).

Le rayon externe effectif (r_e) quant à lui se définit comme la distance (D_i) entre l'axe de l'hélice et l'atome situé le plus loin sur la chaîne latérale pour une conformation donnée et à laquelle on ajoute la valeur du rayon de van der Waals de cet atome. La quantité D_i est schématisée à la Fig. 13 pour les coordonnées cartésiennes d'un résidu Alanine dans une hélice- α (Parry et Suzuki (1969)). Nous montrons aussi sur cette figure les paramètres nécessaires au calcul de D_i . Premièrement, il y a $D_{\alpha i}$ qui est la longueur du segment reliant le C α et l'atome qui nous intéresse. Deuxièmement, il y a θ ,

l'angle que fait $D_{\alpha i}$ et l'axe de l'hélice (axe défini le long de l'axe Z).
Finalement il y a β (représenté comme l'angle alterne sur la Fig. 13), qui

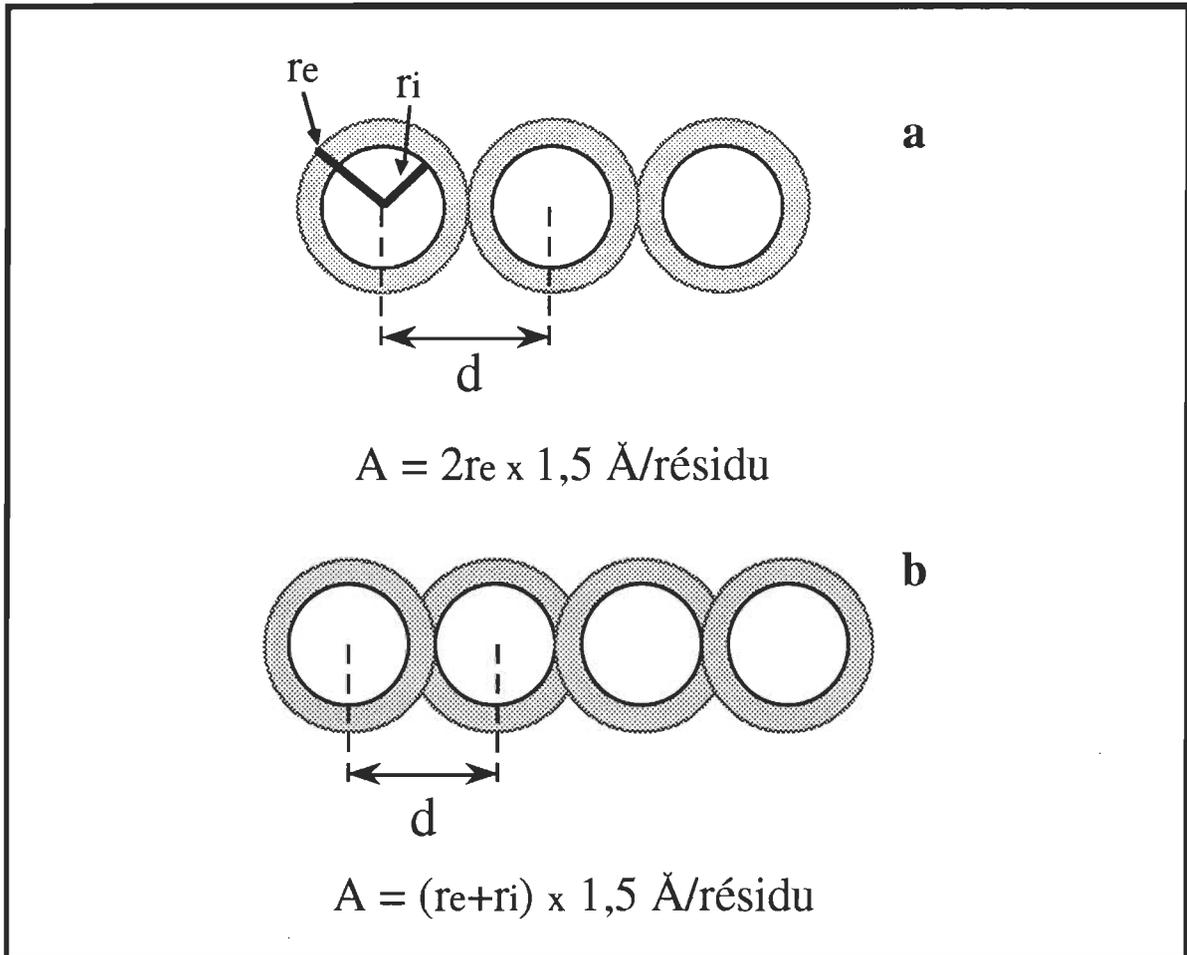


Figure 12. a- Représentation schématique d'une coupe transversale de trois hélices- α en contact *via* les chaînes latérales (organisation côte à côte) représentées par les zones ombrées. Dans cette organisation, la distance entre les hélices est donnée par deux fois le rayon externe qui est délimité par le grand cercle concentrique. L'aire résiduelle (A) correspondante est obtenue en multipliant cette distance ($2r_e$) par la translation d'un résidu, soit $1,5 \text{ \AA}/\text{résidu}$. b- représentation schématique d'une coupe transversale de quatre hélices- α interdigitées. Dans cette organisation la distance entre les hélices est donnée par la somme du rayon externe et du rayon interne qui est délimité par le petit cercle concentrique. L'aire résiduelle (A) correspondante est obtenue en multipliant cette distance ($r_e + r_i$) par la translation d'un résidu, soit $1,5 \text{ \AA}/\text{résidu}$.

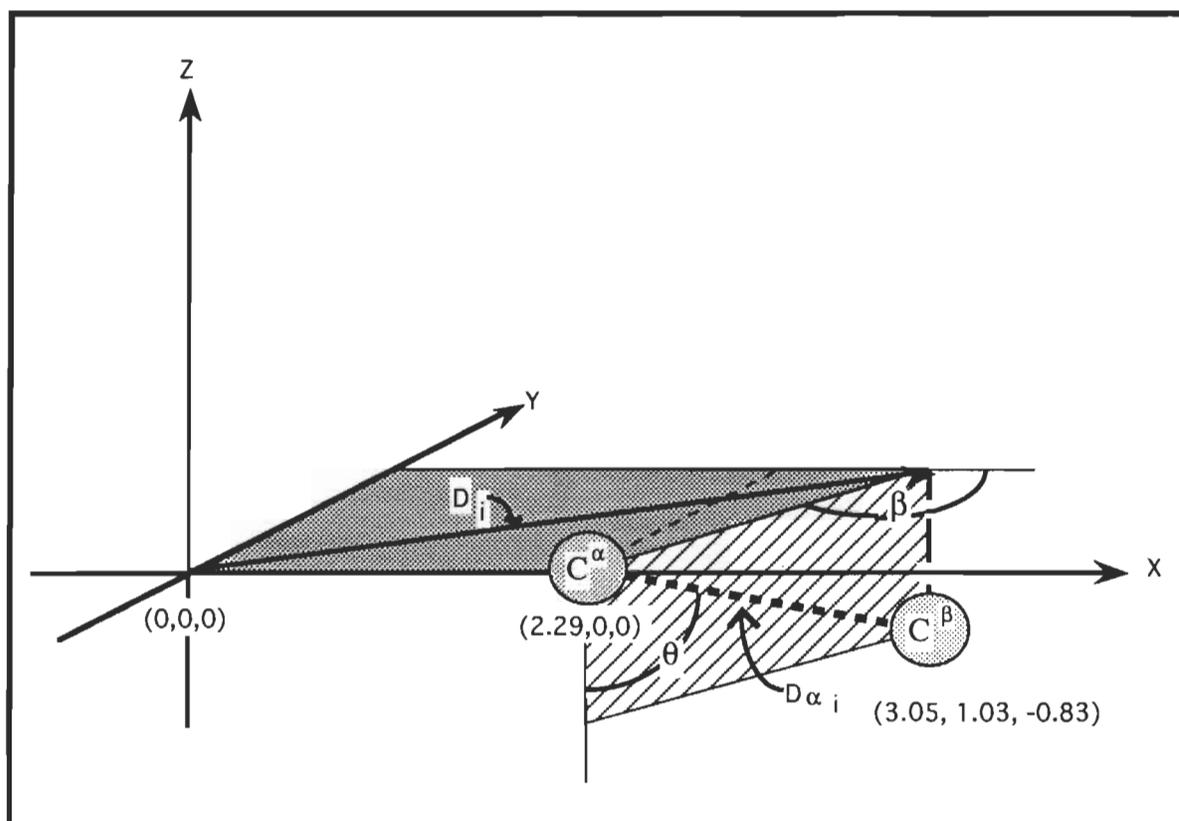


Figure 13. Représentation schématique des coordonnées cartésiennes du C^α et C^β d'un résidu alanine dans une hélice- α . Les paramètres θ , β , $D_{\alpha i}$ et D_i sont définis dans le texte. Coordonnées tirées de Parry et Suzuki (Parry et Suzuki (1969)).

est l'angle que fait la projection de $D_{\alpha i}$ dans le plan XY et le segment reliant le C^α et l'axe de l'hélice centré aux coordonnées $(0,0,0)$.

La loi des cosinus permet de dériver la relation 3.1 pour calculer D_i lorsque que $D_{\alpha i}$, θ et β sont connus.

$$D_i = ((2,29)^2 + (D_{\alpha i} \sin\theta)^2 - 2 \times 2,29 (D_{\alpha i} \sin\theta \cos\beta))^{1/2} \quad (3.1)$$

Nous avons déterminé géométriquement les valeurs de θ et β pour le C^β de l'Alanine dans une hélice- α à partir des coordonnées cartésiennes des C^α et C^β présentées à la Fig. 13. Les valeurs que nous avons déterminées sont respectivement $57,5^\circ$ et 127° . En guise de vérification, si l'on prend une valeur de $D_{\alpha i}$ égale à la longueur du lien C^α - C^β *i.e.* $1,53\text{\AA}$, on peut calculer à l'aide de la relation (3.1) une valeur de D_i égale à $3,22\text{\AA}$ pour le C^β . Cette valeur est en parfait accord avec la distance entre l'axe de l'hélice et le C^β de $3,2\text{\AA}$ rapportée par Parry et Suzuki (Parry et Suzuki (1969)).

Comme nous l'illustrons à la Fig.12a, la distance entre deux hélices côte-à côte, *i.e.* en contact par l'entremise de leurs chaînes latérales est donnée par le diamètre effectif de l'hélice considérée ou deux fois la valeur de son rayon externe effectif. Pour une organisation des hélices où les chaînes latérales sont complètement interdigitées (Fig. 12b), la distance minimale entre les hélices est donnée par la somme du rayon interne effectif et du rayon externe effectif que nous avons choisi. Une fois les distances inter-hélices (d) connues, il suffit de multiplier la valeur de d (en \AA) par la translation d'un résidu dans une hélice- α , $1,5\text{\AA}/\text{résidu}$, pour obtenir l'aire résiduelle en $\text{\AA}^2/\text{résidu}$.

3.2.2 Calcul de la distance entre les hélices- α de PBLG et des aires résiduelles correspondantes pour différentes conformations des chaînes latérales

3.2.2.1 Conformation étendue

Afin de préciser l'organisation des hélices de PBLG au début de la transition nous avons calculé les aires résiduelles pour différents types d'organisations susceptibles d'y exister. Nous avons d'abord considéré des organisations côte-à-côte et interdigitée des hélices avec une conformation toute étendue de la chaîne latérale.

Pour ce faire, nous avons premièrement déterminé géométriquement les valeurs de $D_{\alpha i}$, θ et β à partir des angles et des longueurs de liaisons fournies dans la littérature (Momany *et al.* (1975)) pour une conformation étendue, *i.e.* pour des valeurs d'angles de torsion χ^i toutes égales à 180° . Comme nous le montrons à la Fig. 14, nous avons considéré l'atome d'hydrogène le plus éloigné du C^α pour calculer la valeur de D_i . Pour une telle conformation de la chaîne latérale $\theta = 98^\circ$ et $\beta = 127^\circ$.

En effet, le vecteur reliant l'atome d'H en question et le C^α est situé dans le même plan que la liaison $C^\alpha-C^\beta$ pour laquelle la valeur de β a déjà été évaluée à 127° . $D_{\alpha i}$, la distance entre le C^α et l'atome d'H a été évaluée à 10,7 Å.

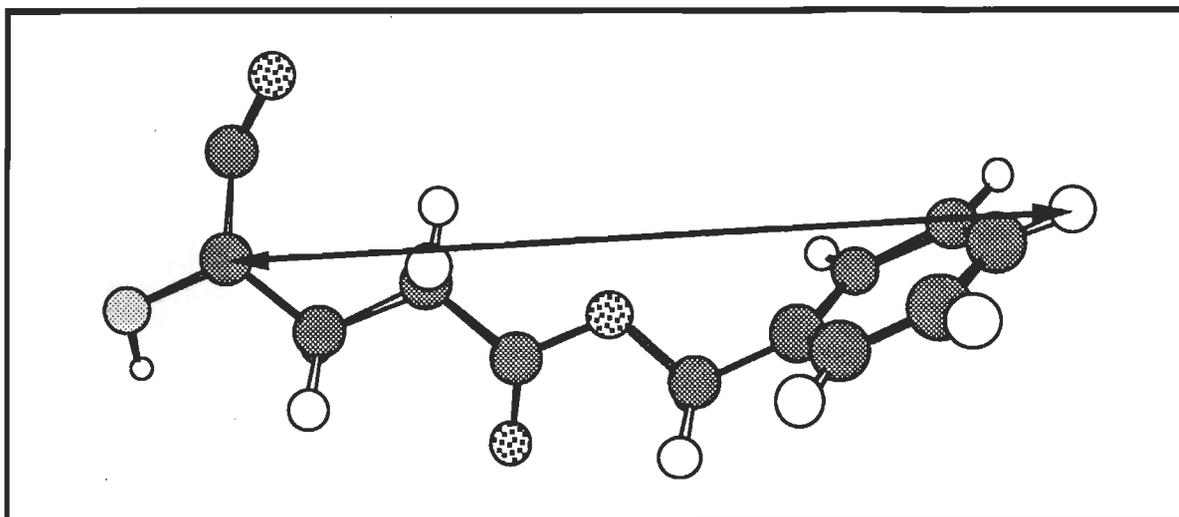


Figure 14. Conformation étendue d'une chaîne latérale d'un résidu benzyle glutamate dans une hélice- α . Pour rendre la figure plus explicite, nous avons choisi de ne pas présenter l' H^α . La double flèche relie le C^α et l'atome d'H le plus éloigné sur la chaîne latérale.

À l'aide de la relation 3.1 et des paramètres que nous venons de déterminer nous pouvons calculer une valeur de D_i égale à 12,2 Å. En ajoutant une valeur de rayon de van der Waals de 1,3 Å pour l'atome d'hydrogène on obtient un rayon externe effectif de 13,5 Å. L'aire résiduelle pour une organisation des hélices côte à côte avec une conformation de la chaîne latérale étendue vaut donc 40,5 Å²/résidu (27,0 Å x 1,5 Å/résidu). En se référant à la Fig 10, il est évident qu'une telle organisation n'existe pas au début de la transition monocouche-bicouche puisqu'elle débute à une valeur de 19,5 Å²/résidu.

Dans un second temps, nous avons considéré une organisation des hélices avec les chaînes latérales complètement interdigitées. Pour une telle

organisation, nous calculons une distance entre les hélices de 16,4 Å. Cette distance est obtenue par la somme du rayon effectif interne (2,9 Å) et du rayon externe effectif (13,5 Å). L'aire résiduelle correspondante est de 24,6 Å²/résidu (Fig. 12b). Cette valeur est beaucoup plus près de la valeur observée au début de la transition monocouche-bicouche (19,5 Å²/résidu), nous indiquant qu'une organisation interdigitée des hélices à cet endroit sur l'isotherme Π -A du PBLG est plus plausible que l'organisation côte à côte précédemment considérée. Cependant, la distance inter-hélices correspondante de 16,4 Å que nous calculons est plus élevée que la valeur de 14,3 Å proposée par Malcolm. Ce dernier, en argumentant sur le fait que cette valeur est beaucoup plus petite que le diamètre d'un hélice- α de PBLG avec une conformation étendue de ses chaînes latérales, propose l'existence d'une organisation interdigitée pour l'état d'entassement limite des hélices de PBLG à l'état monomoléculaire.

D'un autre côté, la distance inter-hélices apparente au début de la transition est de 13,0 Å (19,5 Å²/résidu / 1,5 Å/résidu). Cette valeur est plus petite que les distances inter-hélices calculées par Malcolm et nous. Ainsi, il est justifié de s'interroger sur la pertinence d'une organisation interdigitée au début de la transition monocouche-bicouche. D'un autre côté, en considérant l'aspect qualitatif de notre modèle et l'incertitude que nous pouvons associer à la méthodologie de Malcolm, nous ne pouvons à ce stade remettre en doute cette possibilité. En effet, il est impossible de connaître avec certitude la conformation des chaînes latérales au début de la

transition. Dans cet optique, la conformation étendue de la chaîne latérale représente une limite supérieure et toute déviation de cette conformation devrait contribuer à réduire la distance entre les axes des hélices pour une organisation interdigitée. D'un autre côté, il est permis de douter que l'entassement retrouvé au sein de multicouches et celui retrouvé à l'interface pour une monocouche soient les mêmes. De plus, à cause de leur faible résolution, les études en diffraction des électrons ne peuvent nous renseigner sur la conformation exacte des chaînes latérales (Fasman, G. D. (1967) et Malcolm B. R. (1973)). Ainsi, la valeur de distance inter-hélices mesurée par Malcolm de même que celle que nous calculons ne peuvent servir qu'à proposer la possible existence d'une organisation interdigitée des hélices de PBLG. Si tel était le cas, nos calculs indiquent que la chaîne latérale ne possède vraisemblablement pas une conformation complètement étendue.

En se basant uniquement sur les valeurs de distances inter-hélices que nous venons de discuter, le postulat de l'existence d'une organisation interdigitée des hélices- α de PBLG ne peut être sérieusement remis en doute à ce stade. Cependant, nous proposons dans les paragraphes qui suivent un mode d'interaction alternatif des hélices- α de PBLG et pour lequel nous calculons une distance inter-hélices comparable à celle observée par Malcolm.

3.2.2.2 Conformation repliée

Nous avons considéré une autre conformation de la chaîne latérale qui permettrait aux hélices de PBLG de s'approcher sans interdigitation. Les valeurs d'angles de torsion pour cette conformation sont les suivantes: $\chi^{1,2} = 180^\circ$, $\chi^3 = 0^\circ$, $\chi^4 = -90^\circ$ et $\chi^{5,6} = 180^\circ$ (Fig. 15). Comme nous pouvons le constater, ces angles de torsion amènent les noyaux benzyles près du squelette polypeptidique de l'hélice (Figures 15 et 16).

Notre but est maintenant d'estimer la distance du plan des noyaux benzyles de l'axe de l'hélice. Pour ce faire, nous avons évalué la distance entre l'axe de l'hélice et l'atome d'O ester de la chaîne latérale (Fig. 15).

Comme nous pouvons le constater aux Figures 15 et 16, les noyaux benzyles et l'atome O ester sont situés pratiquement à la même distance de l'axe de hélice. Nous avons procédé de la sorte dans le but de simplifier la détermination de l'angle β . En effet, l'atome O ester est situé dans le même plan que la liaison $C^\alpha-C^\beta$ (Fig. 15). La valeur de β pour cette liaison qui est déjà connue vaut 127° (Fig. 13).

Les valeurs de θ , et $D_{\alpha i}$ pour l'O ester ont été évaluées géométriquement et sont respectivement égales à 57° et $4,0 \text{ \AA}$. Il est maintenant possible de calculer à l'aide de la relation 3.1 une valeur de D_i de $5,1 \text{ \AA}$.

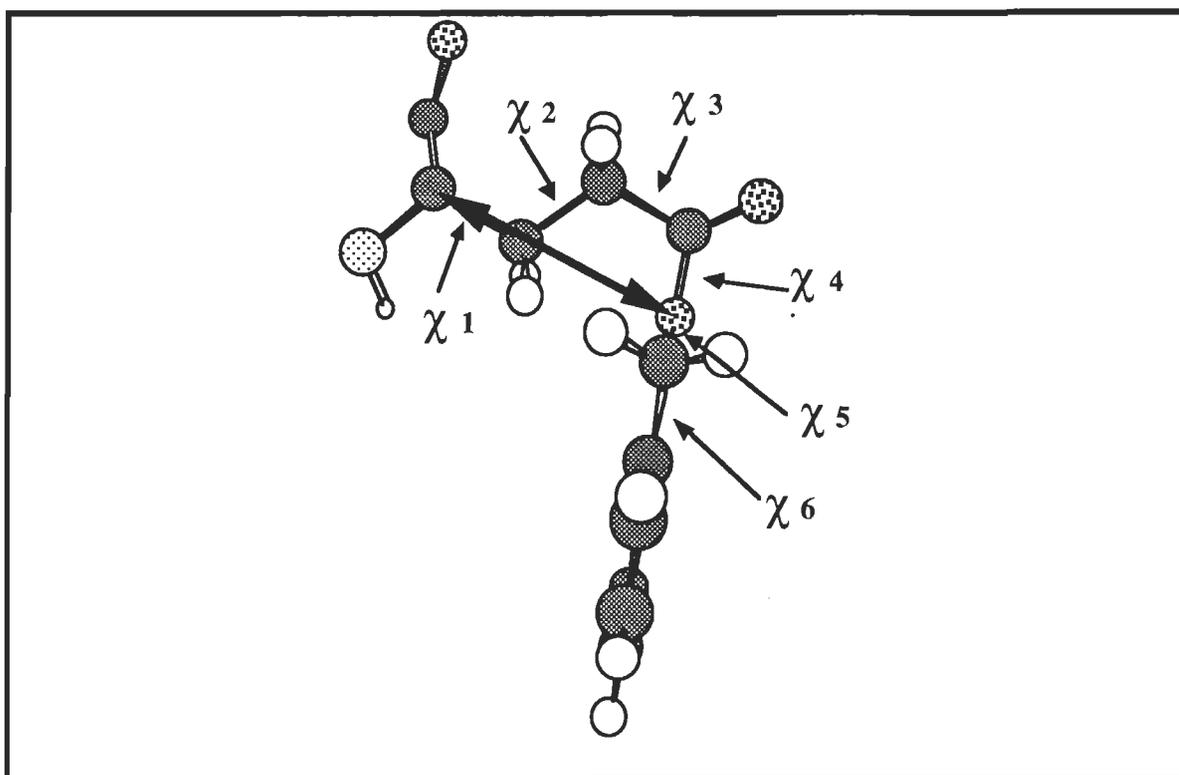


Figure 15. Conformation d'une chaîne latérale d'un résidu benzyle glutamate dans une hélice- α avec les valeurs d'angles de torsion suivantes: $\chi^{1,2} = 180^\circ$, $\chi^3 = 0^\circ$, $\chi^4 = -90^\circ$ et $\chi^{5,6} = 180^\circ$. La double flèche relie le C^α et l'atome O ester. L' H^α n'est pas présenté.

En ajoutant une valeur de rayon de van der Waals égale à $1,75 \text{ \AA}$ (valeur moyenne observée pour les atomes de carbone aromatiques dans les protéines (Creighton, T.E. (1993)) pour les atomes de C du cycle benzyle) nous obtenons un diamètre effectif de $13,7 \text{ \AA}$. Nous rappelons que la distance entre les axes des hélices pour une organisation côte à côte est égale au diamètre effectif (Fig. 12b). Ainsi, en première approximation, nous pouvons attribuer une distance inter-hélices de $13,7 \text{ \AA}$ et une aire résiduelle de $20,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ pour un entassement d'hélices- α de PBLG avec une telle conformation repliée des chaînes latérales.

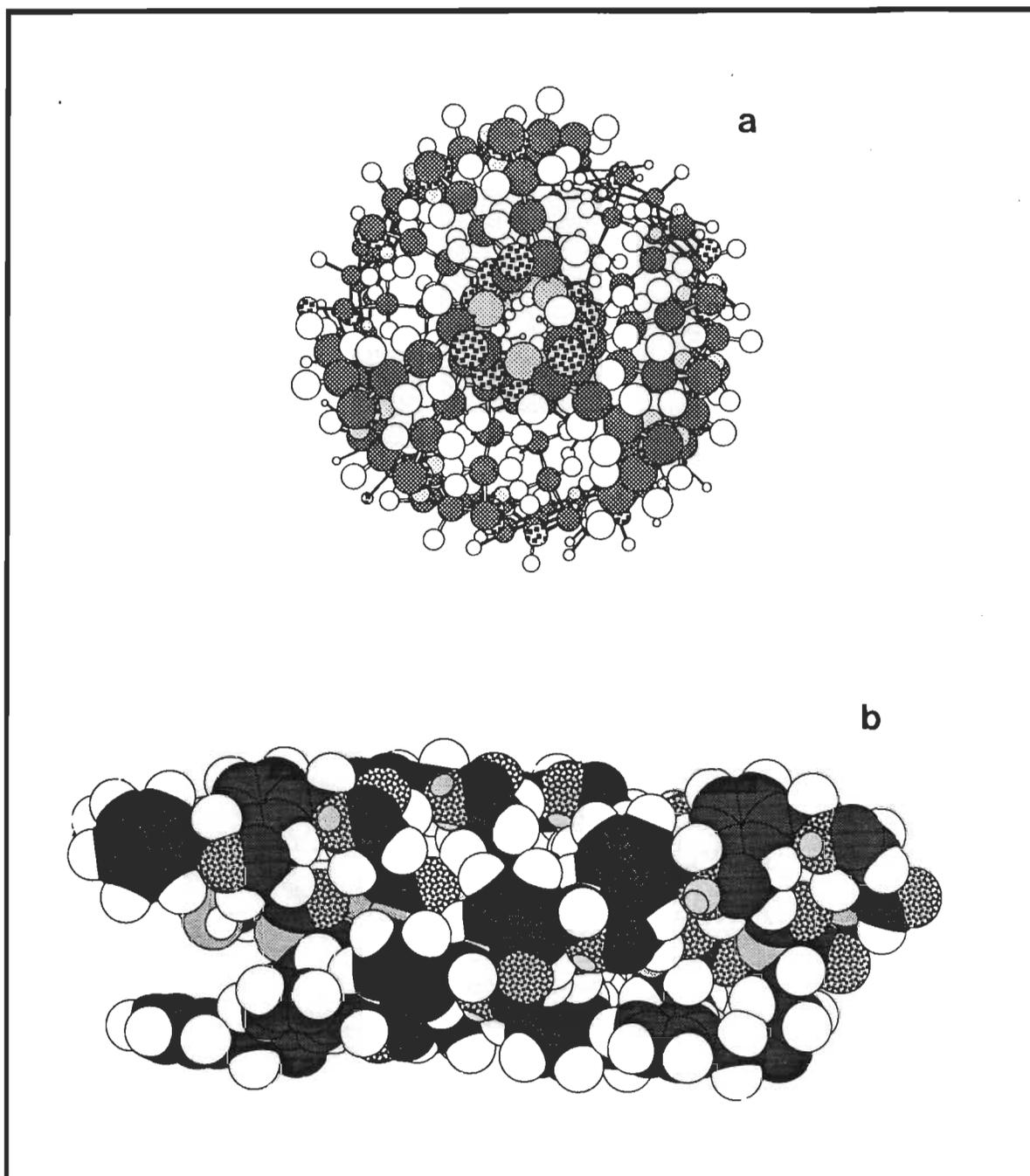


Figure 16. a-Vue dans le sens du grand axe d'une hélice- α de PBLG de 18 résidus de long avec une conformation des chaînes latérales telle que décrite à la Fig.15. b- Vue de côté. Remarquez la co-planarité des O ester et des noyaux benzyles résultant en une quasi équidistance entre les atomes de C des cycles aromatiques et les atomes O ester de l'axe de l'hélice. De plus, remarquez la proximité des noyaux benzyles du squelette polypeptidique.

Comme nous pouvons le constater la distance inter-hélices approximée pour une telle organisation correspond bien à la valeur de distance inter-hélices mesurée par Malcolm, soit $14,3 \text{ \AA}$, à partir de laquelle il propose une organisation interdigitée des hélices- α de PBLG. Ainsi donc, sur la base de cette similitude, il serait tout aussi justifiable de proposer l'existence au début de la transition monocouche-bicouche d'une telle organisation côte à côte des hélices. Compte tenu de la nature approximative de notre modèle, l'accord entre la valeur de distance inter-hélices que nous estimons pour une organisation côte à côte des hélices avec les chaînes latérales repliées ($13,7 \text{ \AA}$) et la valeur apparente observée au début de la transition ($13,0 \text{ \AA}$, *i.e.* $19,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ au début de la transition divisé par $1,5 \text{ \AA}/\text{résidu}$) nous apparaît suffisant pour considérer sérieusement l'existence d'une telle organisation. De plus, dans une telle conformation, les chaînes latérales sont organisées de façon à permettre des interactions favorables entre les noyaux benzyles adjacents et ainsi stabiliser l'entassement côte à côte proposé des hélices de PBLG.

Enfin, comme la conformation exacte de la chaîne latérale au début de la transition monocouche-bicouche n'est pas connue et compte tenu de la nature approximative de notre modèle, il est impossible à ce stade de trancher en faveur de l'une ou l'autre des deux organisations, *i.e.* interdigitée ou entassée côte à côte avec les chaînes latérales repliées. Cependant, à partir de ce que l'on connaît sur les modes d'entassement des hélices- α et des interactions entre les résidus aromatiques au sein des

protéines (section 3.2.3) il est possible de mettre en doute l'existence d'une organisation complètement interdigitée des hélices- α de PBLG au début de la transition monocouche-bicouche.

3.2.3 Comparaison entre les différents modèles d'organisation des hélices- α de PBLG au début de la transition monocouche-bicouche

Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1, l'interdigitation des chaînes latérales nécessite une déformation des hélices (mode d'entassement "bosse dans les trous") et/ou l'existence d'un angle entre leurs grands axes (mode d'entassement "crevasses dans les saillies"). L'interdigitation dans le plan de l'interface des hélices selon le mode "crevasses dans les saillies" nous semble peu vraisemblable. Comme nous l'avons vu un tel mode d'entassement nécessite l'existence d'un angle de 20° entre les axes des hélices. À l'interface, ce mode d'entassement impliquerait qu'une fraction non-négligeable des hélices plonge dans l'eau tandis que l'autre s'élèverait au dessus de la surface. Du simple point de vue de la solubilité dans l'eau du PBLG, cette éventualité doit être écartée. Par contre, une interdigitation des hélices selon le mode "trous dans les bosses" et la formation de super-hélices à deux brins qui devrait en résulter ne présenterait pas cette contrainte de plonger une fraction des hélices dans l'eau. Cependant, l'organisation en super-hélices, que ce soit à l'interface, dans des films collapsés ou même à l'état cristallin laisse des traces. En effet, comme nous l'avons souligné au chapitre 1, les hélices- α organisées en super-hélices à deux brins possèdent

un pas de 5,1 Å plutôt que de 5,4 Å. Or, les études de diffraction des électrons de films affaissés et de diffraction des rayons-X sur des spécimens de PBLG préparés par précipitation montrent que le pas des hélices est bien de 5,4 Å (Fasman, G. D. (1967)). Enfin, certains auteurs prétendent que des hélices- α avec de longues chaînes latérales peuvent s'interdigiter sans se déformer et ce, grâce à la flexibilité des chaînes latérales (Crick, F. H. C (1952)). En se référant à la Fig. 17, on peut remarquer que pour s'insérer entre les autres, une chaîne latérale devrait avoir une conformation étendue afin de minimiser les encombrements stériques. Cependant, nous avons montré à la section 3.2.2 que la distance entre des hélices interdigitées avec les chaînes latérales étendues ne peut atteindre 13,0 Å, *i.e.* la valeur de la distance inter-hélices apparente au début de la transition.

De plus, l'examen de l'environnement immédiat des chaînes latérales aromatiques comme la Phénylalanine à l'intérieur des protéines globulaires nous enseigne que ces dernières sont principalement entourées par d'autres chaînes latérales aromatiques montrant ainsi que les interactions entre noyaux aromatiques y sont hautement favorisées (Burley et Petsko (1988)). Si on considère que le noyau benzyle du PBLG correspond en fait à la chaîne latérale de la Phénylalanine, il n'est pas déraisonnable de penser que les interactions benzyle-benzyle entre les hélices de PBLG à l'interface air-eau devraient être elles aussi favorisées. En conséquence, si les hélices de PBLG s'interdigitaient à l'interface air-eau, la ségrégation des résidus aromatiques observée chez les protéines globulaires nous pousse à croire

que l'interdigitation des chaînes latérales devrait être effectivement partielle.

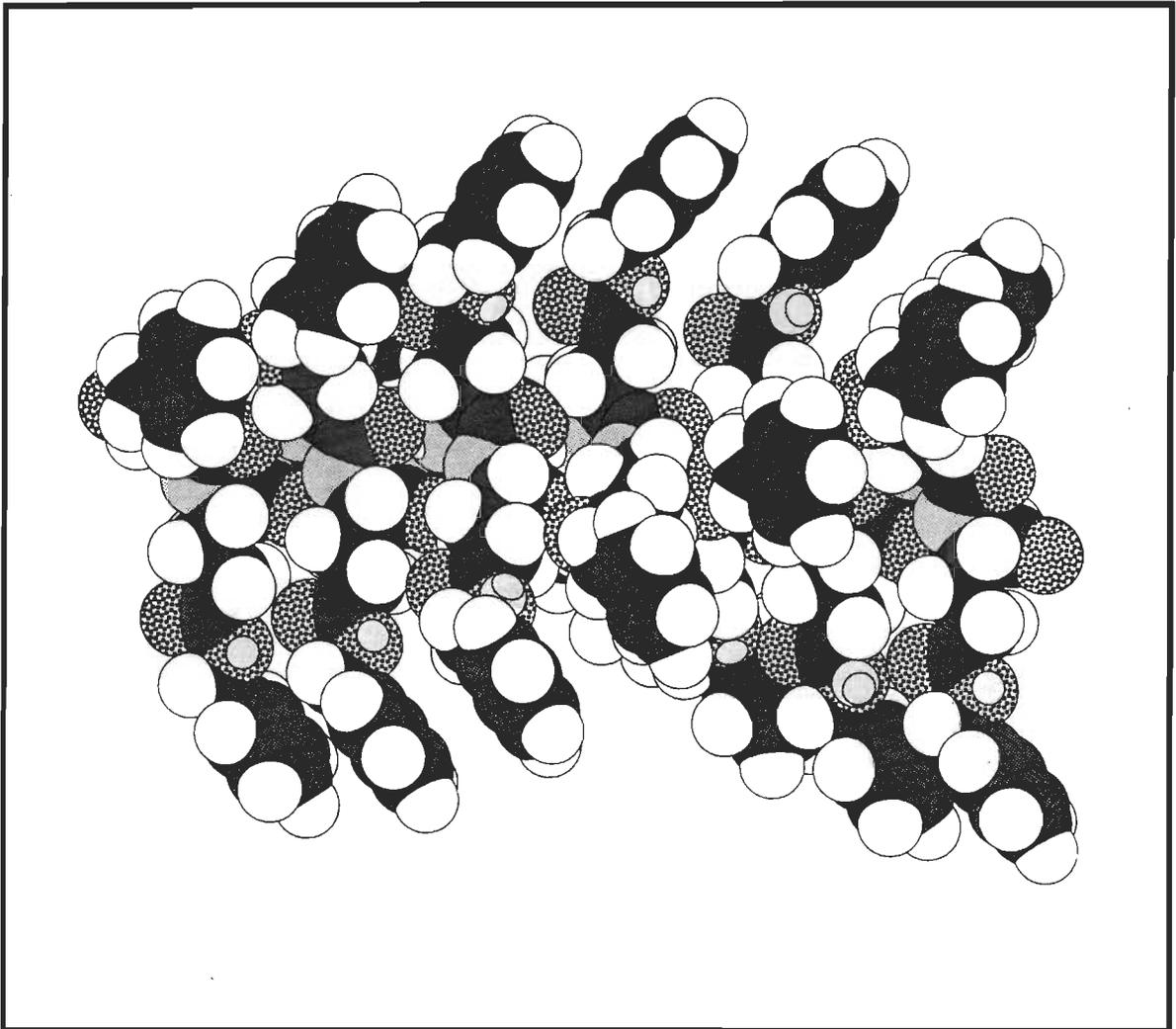


Figure 17. Vue de côté d'une hélice- α de PBLG de 18 résidus de long avec une conformation toute étendue des chaînes latérales.

D'un autre côté, en considérant le cas où la chaîne latérale est repliée, cette organisation permet à la fois aux hélices- α de PBLG d'exposer

favorablement leur noyaux benzyles pour un recouvrement des orbitales π dans le plan de l'interface et de s'approcher à une distance comparable à celle observée au début de la transition. Une organisation semblable des chaînes latérales a déjà été rapportée pour la minimisation de l'énergie potentielle des interactions entre molécules de poly-p-Cl-benzyl-L-aspartate (Fig. 18).

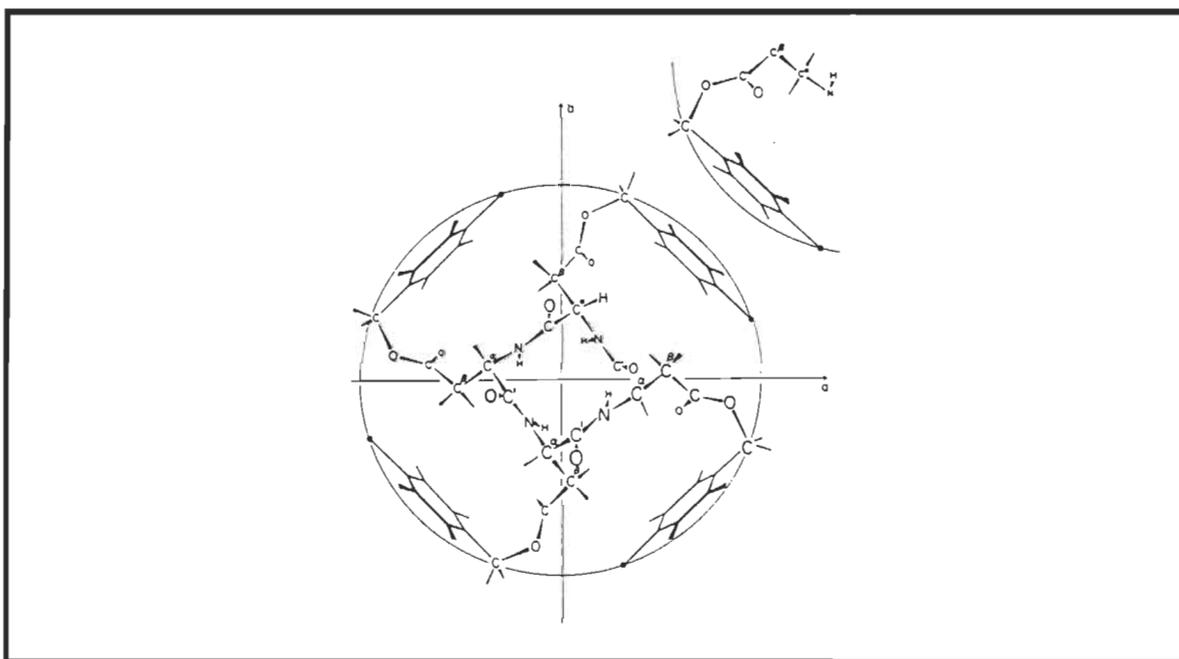


Figure 18. Représentation schématique des interactions inter-hélices entre molécules de poly-p-Cl-benzyl-L-aspartate obtenue par la minimisation de l'énergie potentielle d'interaction. Remarquez l'organisation en hélice- π des molécules. Tirée de Scheraga, H. A. (1981).

Le poly-p-Cl-benzyl-L-aspartate existe sous forme d'hélice- α en solution (Scheraga, H. A. (1981)). Cependant, comme nous pouvons le remarquer sur cette figure, les résultats de la minimisation énergétique suggèrent que

les interactions entre les noyaux aromatiques par un recouvrement des orbitales π seraient enthalpiquement favorables au point de transformer l'hélice- α en hélice- π à l'état cristallin (hélice à 4,4 résidus par tour). L'existence d'une organisation du squelette polypeptidique en hélice- π dans des spécimens cristallins de poly-p-Cl-benzyl-L-aspartates a été effectivement observée par diffraction des rayons-X (Scheraga, H. A. (1981)).

Cependant, il est clair à partir du spectre infrarouge que nous avons enregistré (Fig. 11) que cette transition hélice- α - hélice- π n'est pas observée dans le cas du PBLG. La position des bandes Amides I et II sont caractéristiques d'une organisation en hélice- α . Cependant, nous n'avons pas trouvé dans la littérature la position des bandes Amides I et II pour une organisation du squelette polypeptidique en hélice- π . La transition hélice- α - hélice- π du poly-p-Cl-benzyl-L-aspartate pourrait être le résultat d'une moins grande flexibilité de sa chaîne latérale en comparaison avec celle du PBLG qui possède une liaison C-C de plus. Ainsi, une fois formé, le recouvrement des orbitales π pour des chaînes latérales moins flexibles et contenant des noyaux aromatiques forcerait le squelette polypeptidique à se réorganiser. D'un autre côté, les interactions entre noyaux aromatiques ne sont pas restreintes à un recouvrement des orbitales π . En raison des charges partielles négatives portées par les atomes de C et des charges partielles positives portées par les atomes d'H sur un noyaux benzyle, des interactions polaires de type van der Waals peuvent s'établir entre de tels

groupements. Dans leur analyse de l'entourage des chaînes latérales aromatiques à l'intérieur des protéines globulaires, Burley et Petsko (Burley et Petsko (1988)) ont répertorié différents arrangements des noyaux aromatiques explicables par des interactions de nature électrostatique qui seraient toutes aussi favorables d'un point de vue enthalpique que le recouvrement des orbitales π sans nécessiter un empilement (stacking) parfait des noyaux aromatiques. Parmi ces arrangements, Burley et Petsko ont observé de façon récurrente celui que nous présentons à la Fig. 19.

Dans cet arrangement, les plans des noyaux aromatiques sont presque coplanaires. En fait, ils forment un angle de 20° . Ainsi, l'atome d'H en position para sur un noyau interagit avec l'atome de C en position para sur l'autre noyau. Il est à noter que cet arrangement n'est pas le seul observé au sein des protéines globulaires.

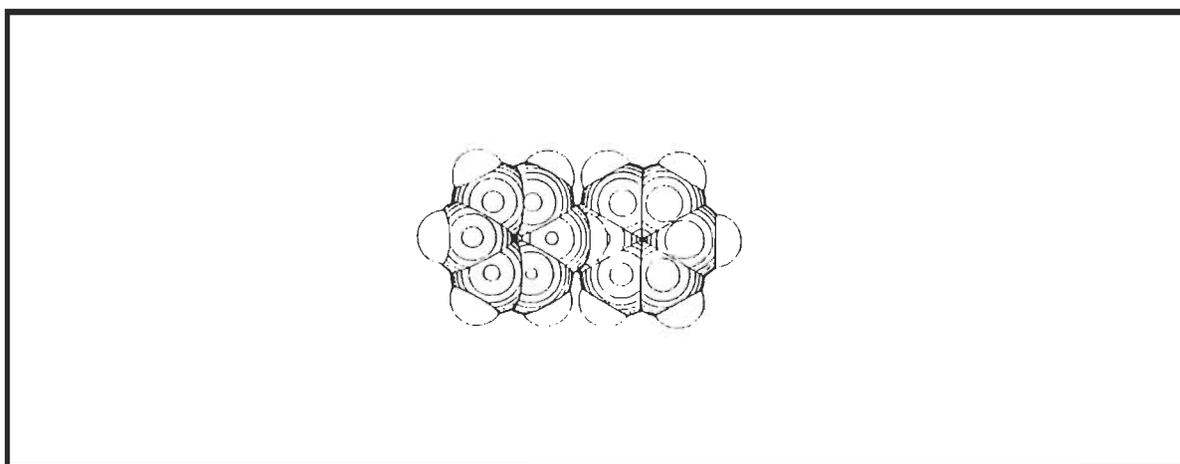


Figure 19. Arrangement entre deux molécules de benzène correspondant à une géométrie enthalpiquement favorable. Tiré de Burley et Petsko (1988).

À l'instar du benzène solide, des arrangements avec des angles de 90° entre les plans sont aussi répertoriés (Burley et Petsko (1988)).

Alors en considérant, 1) que par une géométrie coplanaire ou quasi-coplanaire des noyaux benzyles peuvent former des interactions fortes au sein des protéines et des homopolypeptides hydrophobes par recouvrement de leur orbitales π ou par interactions électrostatiques, 2) qu'une conformation repliée de la chaîne latérale flexible du PBLG pourrait amener les noyaux benzyles d'hélices- α adjacentes à adopter une géométrie coplanaire ou quasi-coplanaire favorable à l'établissement de ce type d'interaction, 3) que pour une telle organisation des chaînes latérales, les hélices peuvent s'approcher à une distance comparable à celle observée au début de la transition, nous proposons que l'entassement limite des hélices- α de PBLG à l'interface air-eau devrait correspondre à une organisation côte-à-côte des hélices avec les chaînes latérales repliées plutôt qu'à une organisation interdigitée telle que proposée par Malcolm (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)).

3.3 Organisation et comportement du PBLG aux grandes aires résiduelles

Nous avons déjà mentionné que le comportement du PBLG aux grandes aires résiduelles n'a jamais été caractérisé de façon précise. Les seules informations contenues dans la littérature sur ce sujet font état d'une

non-reproductibilité de l'isotherme ΔV -A avant le point de décollement de Π (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). Cette non-reproductibilité fut interprétée par la présence d'inhomogénéités à ces grandes valeurs d'aires résiduelles (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)). Nous avons pour la première fois clairement visualisé ces présumées inhomogénéités par microscopie à épifluorescence (section 3.3.2). Nous montrons que ces inhomogénéités correspondent en fait à des agrégats incompressibles. En plus d'expliquer la non-reproductibilité de l'isotherme ΔV -A aux grandes valeurs de A, l'existence de ces agrégats nous permet d'expliquer l'allure de l'isotherme ΔV -A entre le point de décollement de Π et le début de la transition monocouche-bicouche. De plus, la présence de ces agrégats indique que les hélices- α de PBLG s'auto-organisent spontanément, ce qui pourrait s'expliquer par le type d'interaction inter-hélices que nous proposons.

3.3.1 L'isotherme de potentiel de surface ΔV -A du PBLG

Nous présentons à la Fig. 20 l'isotherme ΔV -A du PBLG que nous avons mesurée. Comme nous pouvons le constater et conformément à ce qui est rapporté dans la littérature (Malcolm, B. R. (1971 et 1973)), le potentiel de surface demeure constant à 450 mV tout au long de la transition monocouche-bicouche *i.e.* entre 19,5 et approximativement 11,0 Å²/résidu. On peut aussi remarquer une légère chute du ΔV d'environ 50 mV entre 11,0 et 10,0 Å²/résidu et l'existence d'un plateau par la suite. De façon générale, entre le point de décollement de Π (flèche a sur la Fig. 20) et le début de la transition (flèche b) nous observons une légère montée de ΔV .

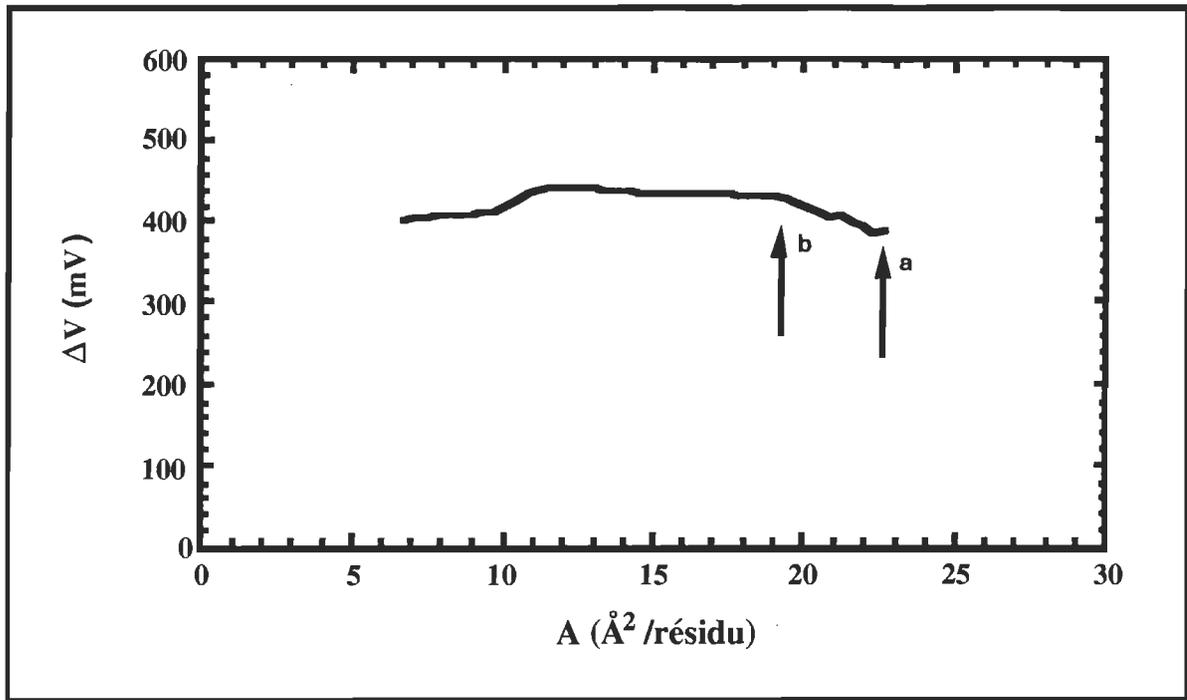


Figure 20. Isotherme de potentiel de surface (ΔV) - aire résiduelle (A) obtenue pour le PBLG étalé à l'interface air-eau bidistillée en utilisant le chloroforme comme solvant d'étalement. $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$. Degré de polymérisation = 105.

Pour les valeurs de A plus grandes que le point de décollement de Π l'isotherme n'est pas reproductible, ce qui explique pourquoi nous ne présentons pas les valeurs de ΔV mesurées dans cette région de l'isotherme. En effet, les valeurs de ΔV enregistrées dans cette région de l'isotherme sont très variables avec une limite inférieure de 0 mV pour les aires résiduelles élevées (plus grandes que $30 \text{\AA}^2/\text{résidu}$) et une limite supérieure de 390 mV observée au point de décollement de Π .

Avant d'aller plus loin dans l'analyse du comportement de ΔV aux valeurs de A plus grandes que celle du début de la transition monocouche-

bicouche nous nous penchons brièvement sur l'origine du plateau et de la légère chute de ΔV vers la fin de la transition monocouche-bicouche. Au chapitre 2, nous avons mentionné qu'il existe principalement deux contributions possibles au ΔV que nous mesurons: une contribution de la double couche ionique diffuse et une contribution dipolaire. Comme la sous-phase ne contient pas d'ions et que le PBLG est globalement neutre, la contribution de la double couche ionique diffuse est nulle. Le signal que nous mesurons a donc une origine essentiellement dipolaire. Cette contribution dipolaire peut provenir directement du moment dipolaire du squelette polypeptidique des hélices, d'un moment dipolaire des chaînes latérales et, indirectement, de la réorientation des dipôles des molécules d'eau en contact avec les molécules de PBLG (Malcolm, B. R (1971 et 1973)). Comme les hélices ont leur grand axe parallèle au plan de l'interface, aucune contribution perpendiculaire à l'interface n'est à prévoir de la part du macro-dipôle des hélices (Chapitre 1). De plus, une contribution nette pouvant provenir des moments dipolaires associés aux chaînes latérales n'est pas à prévoir si l'organisation de ces dernières est isotrope de part et d'autre de l'interface (Malcolm, B. R. (1973)). Ainsi donc, en première approximation, on peut supposer que le signal mesuré proviendrait principalement de la réorientation des dipôles des molécules d'eau en contact avec les molécules de PBLG (Malcolm, B. R. (1971 et 1973)). Le signe positif du ΔV implique que les molécules d'eau sont préférentiellement réorientées avec leur extrémité positive orientée vers l'électrode radioactive (Gaines, G. L. (1966)). Donc, l'observation d'un

plateau de ΔV résulterait du fait que la nature de l'interface PBLG-eau et la densité surfacique des molécules d'eau réorientées sondées par l'électrode radioactive ne changent pas durant la transition monocouche-bicouche et que les hélices qui forment la deuxième couche ne contribuent pas directement au potentiel de surface. Nous verrons que cette explication est juste mais elle est de nature circonstancielle.

En effet, lors de nos mesures de ΔV , l'électrode radioactive est toujours positionnée près du flotteur afin, entre autre, de maximiser la surface balayée par la barrière mobile. D'un autre côté, Malcolm a démontré pour des homopolypeptides hydrophobes avec de longues chaînes latérales que la bicouche se forme près de la barrière mobile et se déplace vers le flotteur de la balance à mesure que la surface disponible est diminuée (Malcolm, B. R. (1985 a et b)). Dans ces conditions, l'électrode radioactive étant située loin de la barrière mobile et près du flotteur, elle ne peut mesurer des variations de ΔV associées à la formation de la bicouche qu'une fois que celle-ci couvre entièrement la surface. Le plateau de ΔV observé résulte donc du fait que durant la transition monocouche-bicouche l'électrode radioactive ne sonde que l'état monomoléculaire du film dont l'organisation ne change apparemment pas. Ainsi, la chute de ΔV observée entre 11,0 et 10,0 Å²/résidu serait la manifestation de "l'arrivée" de la bicouche et de la fin de la transition monocouche-bicouche comme telle, transition en fait mal définie sur l'isotherme Π -A. Il est intéressant de noter le rapport de deux entre l'aire résiduelle au début de la transition (19,5

$\text{\AA}^2/\text{résidu}$) et l'aire résiduelle à fin de la chute de ΔV ($10,0 \text{\AA}^2/\text{résidu}$). Ainsi, l'aire résiduelle de $10,0 \text{\AA}^2/\text{résidu}$ pourrait correspondre à l'aire résiduelle d'une bicouche complète à l'interface et à la fin de la transition monocouche-bicouche. Dans ce sens, le positionnement de l'électrode radioactive près de la barrière mobile peut donc s'avérer avantageux pour identifier avec plus de précision l'aire résiduelle de la fin de la transition monocouche-bicouche du PBLG (et pour des homopolypeptides du même type que le PBLG), nous l'avons souligné est mal définie sur l'isotherme Π -A.

La chute de ΔV d'environ 50 mV entre 11,0 et $10,0 \text{\AA}^2/\text{résidu}$ pourrait être attribuée à une contribution dipolaire directe du squelette polypeptidique et/ou d'un arrangement anisotrope des chaînes latérales des hélices de la seconde couche s'opposant à la contribution dipolaire des molécules d'eau réorientées dans l'état monomoléculaire. D'un autre côté, comme ΔV est considéré comme étant proportionnel au potentiel électrostatique ψ généré par la réorientation des dipôles des molécules d'eau à la surface aqueuse (chapitre 2), la présence d'une couche supplémentaire de PBLG entre l'interface eau-PBLG et l'électrode radioactive pourrait agir comme un "écran" au potentiel électrostatique à l'interface eau-PBLG. Le potentiel électrostatique ($\psi \approx (q/4\pi\epsilon) (1/r)$), Bockris et Reddy (1977)) décroît inversement avec de la distance (r) et la constante diélectrique du milieu (ϵ). Ainsi, la présence d'une seconde couche de PBLG résulterait en une augmentation de la distance sur laquelle le potentiel électrostatique

décroit sous l'effet d'un diélectrique avec comme résultat que le champ électrique net généré par la surface soit diminué. Une autre façon de concevoir cet effet serait de considérer la possibilité de l'induction d'un contre-champ (chapitre 2) par les charges partielles situées à l'interface eau-PBLG dans la seconde couche. Nous devons assumer cependant pour un tel effet "d'écran" que la densité surfacique de dipôles réorientés ne change pas entre l'état monomoléculaire et bimoléculaire et que les molécules de la seconde couche ne possèdent pas de moment dipolaire perpendiculaire. Compte tenu du rapport du simple au double entre l'aire résiduelle observée à la fin de la chute de ΔV et l'aire résiduelle du début de la transition, la densité surfacique de dipôles de molécules d'eau réorientées à l'interface PBLG-eau pour l'état bimoléculaire ne devrait pas être sensiblement différente de celle de l'état monomoléculaire. Ainsi l'effet "d'écran" proposé pourrait être un facteur déterminant pour l'explication de la chute de ΔV observée.

D'un autre côté, il est difficile à ce stade-ci, d'expliquer quantitativement à quoi correspond réellement la chute de potentiel de surface observée à la fin de la transition. La solution de ce problème nécessiterait une modélisation approfondie qui déborde l'objectif du présent travail. Cependant, comme nous nous intéressons pour la suite du travail à la variation de ΔV avant la transition monocouche-bicouche, nous considérerons que le potentiel de surface provient principalement de la réorientation des dipôles des molécules d'eau en contact avec les molécules

de PBLG, que la contribution du squelette polypeptidique est nulle et que la contribution des chaînes latérales est négligeable et constante. Cette assertion n'est évidemment valable que si l'organisation des chaînes latérales ne change pas en cours de compression dans cette région de l'isotherme.

Afin de mieux caractériser le comportement du PBLG et l'allure de l'isotherme ΔV -A avant l'obtention du plateau, nous avons observé par microscopie à épifluorescence, les films de PBLG à différents endroits de l'isotherme Π -A et analysé le comportement des valeurs de μ_{\perp} avant la transition monocouche-bicouche.

3.3.2 Mesures en microscopie à épifluorescence à l'interface air-eau et analyse des valeurs de μ_{\perp} du PBLG aux valeurs d'aires résiduelles supérieures à celle du début de la transition

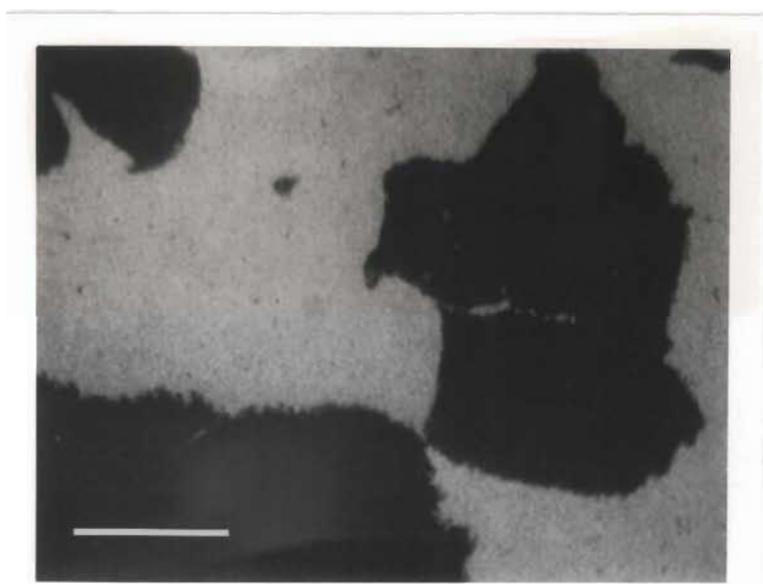
Les détails relatifs à la méthodologie employée sont présentés au chapitre 2. Nous rappelons seulement qu'afin de visualiser les agrégats, une solution de Rhodamine B (un fluorophore) fut injectée sous les films.

Nous présentons à la Fig. 21 une micrographie d'un film de PBLG prise à une aire résiduelle de $30 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, 20 minutes après l'étalement. On peut clairement remarquer la présence d'agrégats de PBLG en foncé. Les zones grises représentent l'interface apparemment dépourvue de molécules de PBLG où la Rhodamine B s'adsorbe préférentiellement. À partir de cette micrographie, nous pouvons facilement concevoir la variabilité du potentiel

de surface lorsque la pression de surface est nulle ou lorsque que la valeur de A est plus grande que la valeur du décollement de Π . En effet, nous pouvons constater que les agrégats sont distancés les uns des autres laissant ainsi une fraction de la surface disponible dépourvue de molécules pouvant contribuer au signal de ΔV . Pour les valeurs de A élevées, la densité d'agrégats sera faible et par conséquent ΔV le sera aussi et, à la limite, la valeur de ΔV peut être nulle si la surface sous l'électrode radioactive est momentanément dépourvue d'agrégats.

L'existence de ces agrégats montre que les hélices- α de PBLG ont la propriété de s'auto-organiser spontanément suite à leur étalement à l'interface air-eau. Cette auto-organisation résulte nécessairement d'interactions inter-hélices fortes dans le plan de l'interface. En effet, les agrégats sont très stables et semblent totalement incompressibles: leur forme ne change pas, même 90 minutes après l'étalement ou lorsque qu'ils entrent en contact. Comme nous l'avons proposé à la section 3.2, un entassement des hélices- α de PBLG avec une conformation repliée des chaînes latérales pourrait amener les noyaux benzyles dans une orientation géométriquement favorable à l'établissement de telles interactions fortes. D'un autre côté, comme nous l'avons vu, nous avons calculé pour un tel type d'entassement une aire résiduelle comparable à celle du début de la transition monocouche-bicouche.

Figure 21. Page suivante. Micrographie d'un film de PBLG prise à $30 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$.
Grossissement: 400X: Concentration de rhodamine B dans la sous-phase: 100 nM. La barre
vaut $50 \mu\text{m}$.

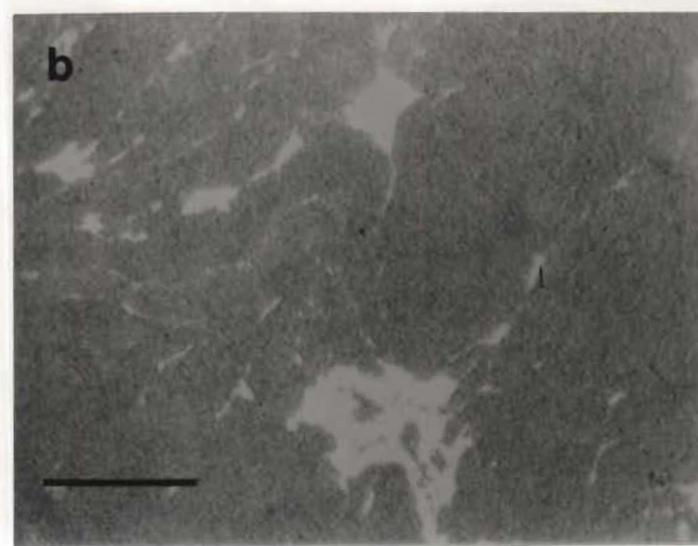
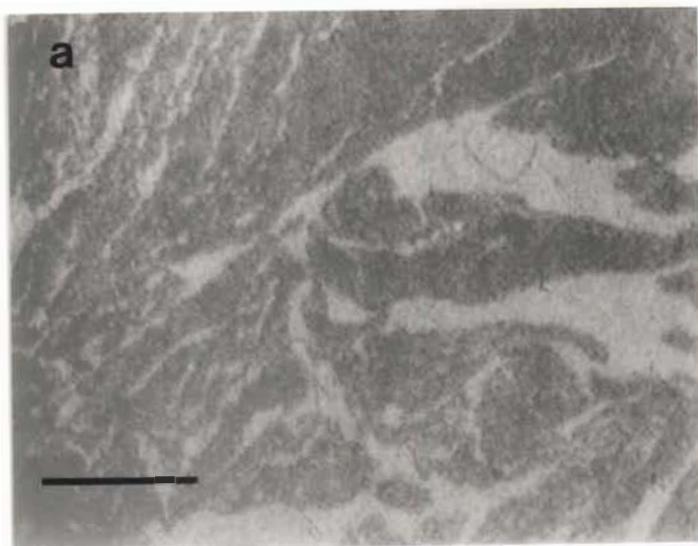


L'éventualité d'une organisation spontanée des hélices- α de PBLG dans une organisation semblable sinon identique à celle existant au début de la transition monocouche-bicouche doit être considérée. Pour une telle situation, la réduction de l'aire résiduelle apparente (l'aire résiduelle calculée en divisant le nombre de résidus déposés par la surface disponible) devrait résulter en une augmentation graduelle de la densité des agrégats jusqu'à ce que la surface en soit entièrement recouverte. C'est effectivement ce que nous avons observé. Nous présentons à la Fig. 22 deux micrographies d'un film de PBLG prises avant le point de décollement de Π ($26,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, Fig 22 a) et entre le point de décollement de Π et le début de la transition ($20,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, Fig. 22 b).

Comme nous pouvons le constater sur ces deux micrographies, la densité des agrégats augmente à mesure que l'on s'approche du début de la transition. Au début de la transition aucune fluorescence de la Rhodamine est observée (résultat non-présenté), indiquant ainsi que le film est homogène, la surface à cet endroit étant uniformément couverte de molécules de PBLG.

L'existence de ces agrégats peut aussi être démontrée indirectement à partir du graphique du moment dipolaire μ_{\perp} , calculé à l'aide de la relation 2.9, en fonction de A (Fig. 23).

Figure 22. Page suivante. Micrographies d'un film de PBLG présent à A: 26,0 Å²/résidu et B: 20,5 Å²/résidu. Grossissements: 200X. Concentration de rhodamine B dans la sous-phase: 100 nM. Les barres valent 100 µm.



Le moment dipolaire perpendiculaire calculé décroît de façon linéaire pour les valeurs de A inférieures à celle du début de la transition monocouche-bicouche (flèche b sur la Fig. 23). Mais en considérant le fait que pour ces valeurs de A , le film de PBLG n'a plus une organisation bidimensionnelle, que la surface des résidus en contact avec l'eau ne devrait plus changer et que ΔV demeure en conséquence plutôt constant (Fig. 20), l'observation d'une telle décroissance du moment dipolaire calculé résulte du fait que les valeurs de A , telles qu'estimées par la division du nombre de résidus par la surface accessible et utilisées pour calculer le moment dipolaire, sont sous-estimées avec comme résultat des valeurs de moments dipolaires calculées qui sont aussi sous-estimées.

En effet, comme la nature de l'interface PBLG-eau sondé par l'électrode radioactive ne change plus à partir du début de la transition monocouche-bicouche, le moment dipolaire devrait en principe demeurer plutôt constant pour des valeurs de A plus petites que celle du début de la transition. Ainsi, nous pouvons le constater, l'utilisation directe de la relation 2.9 n'est valable que pour des films ayant une organisation bidimensionnelle.

On peut maintenant se demander comment se comporte le moment dipolaire calculé en fonction de A dans la région de l'isotherme ΔV - A comprise entre le point de décollement (flèche a, Fig. 20) et le début de la

transition monocouche bicouche (flèche b, Fig. 20), et durant laquelle les films de PBLG ont une organisation bidimensionnelle.

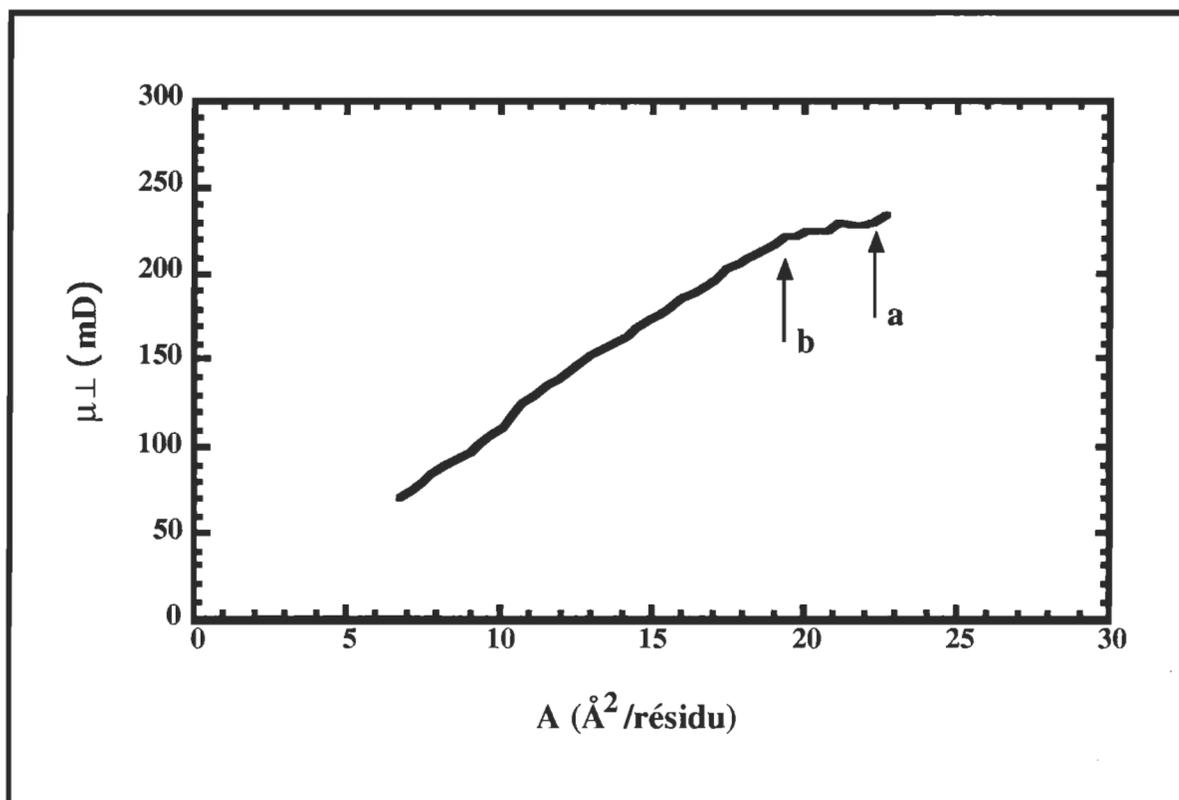


Figure 23. Graphique du moment dipolaire μ_{\perp} , calculé à partir de la relation 2.9 et des valeurs de ΔV présentées sur l'isotherme ΔV -A du PBLG (Fig.20) en fonction de A.

Comme nous pouvons le voir à la Fig. 23, le moment dipolaire diminue légèrement entre ces deux points. Ce résultat est à première vue contradictoire. En effet, nous avons montré au chapitre 2 que ΔV devrait être en première approximation directement proportionnel à μ_{\perp} (relation 2.8). Alors comment expliquer le fait que nous observons une légère augmentation de ΔV dans cette région de l'isotherme ΔV -A pendant qu'une

décroissance de μ_{\perp} est observée dans la même région (Fig. 23). Cette contradiction peut être levée par le simple fait que l'aire résiduelle apparente *i.e.* l'aire résiduelle estimée par la division du nombre de résidus étalés par la surface accessible est surestimée par rapport à l'aire résiduelle réelle des résidus de PBLG qui contribuent au ΔV parce que les molécules de PBLG sont organisées en agrégats entre le point de décollement et le début de la transition.

Ainsi, la légère augmentation du ΔV observée entre le point de décollement et le début de la transition (Fig. 20) peut être attribuée à l'augmentation de la densité des agrégats sous l'électrode radioactive. En effet, une augmentation de la densité de ces agrégats incompressibles devrait être nécessairement accompagnée d'une augmentation de la densité surfacique de molécules d'eau réorientées jusqu'à l'obtention d'une densité limite correspondant à celle d'une monocouche homogène et pour laquelle correspond un ΔV limite, *i.e.* la valeur observée au plateau. Cette interprétation du comportement de ΔV tient à condition que les agrégats soient plus petits que la surface de détection de l'électrode. Comme le diamètre des agrégats observés (Figures. 21 et 22) est de l'ordre de la centaine de μm et que la surface de détection est de l'ordre du cm^2 , cette interprétation nous semble justifiée. De plus, compte tenu de la nature incompressible des agrégats, une contribution importante provenant d'une réorganisation des chaînes latérales nous apparaît peu probable. De plus, la montée de Π observée entre le point de décollement où tous les agrégats

seraient en contact et le début de la transition où le film est devenu homogène pourrait être attribuée au travail nécessaire pour former une monocouche homogène à partir d'agrégats incompressibles.

3.4 Conclusion

À partir de l'analyse des valeurs de μ_{\perp} et des micrographies obtenues en microscopie de fluorescence, il apparaît clairement que les hélices- α de PBLG possèdent la propriété de s'auto-organiser spontanément aux grandes valeurs de A . Cette auto-organisation doit être le résultat d'interactions inter-hélices fortes. En effet, l'organisation du PBLG dans les agrégats apparaît très stable et incompressible. Ainsi, en première approximation, la force agissante responsable de cette auto-organisation pourrait être fournie par une interdigitation des chaînes latérales ou, comme nous le proposons, par une organisation côte à côte des hélices *via* l'apposition de noyaux benzyles avec une conformation repliée des chaînes latérales. Par contre, nous montrons que l'interdigitation des chaînes latérales à l'interface air-eau contraint l'approchement entre les hélices. En effet, bien qu'une interdigitation partielle entre des hélices dans le plan de l'interface puisse être envisageable, nous montrons qu'il est peu probable que la distance entre les hélices puisse atteindre la distance inter-hélices observée au début de la transition monocouche-bicouche. En contrepartie, nous montrons qu'un entassement des hélices médiées par des interactions enthalpiquement favorables entre les noyaux benzyles peut atteindre une valeur de distance inter-hélices semblable à celle observée au début de la transition

monocouche bicouche. De plus, comme les noyaux benzyles sont près du squelette polypeptidique, un tel entassement devrait posséder une compressibilité moindre qu'un entassement partiellement interdigité. Ainsi que nous l'avons montré, les isothermes Π -A et ΔV -A du PBLG entre le point de décollement et le début de la transition, peuvent être expliquées par un entassement progressif d'agrégats incompressibles. Dans ces conditions, il est juste de considérer que l'arrangement des hélices à l'intérieur des agrégats est similaire à celui observé au début de la transition monocouche-bicouche et du plateau de potentiel de surface. Dans ce contexte, nous proposons que l'organisation des hélices- α de PBLG à l'intérieur des agrégats et au début de la transition, correspond plutôt à un entassement médié par l'apposition des noyaux benzyles avec une conformation repliée des chaînes latérales plutôt qu'à une organisation interdigitée telle que proposé par Malcolm (Malcolm, B. R. (1973)).

CHAPITRE 4

LES PROPRIETES INTERFACIALES DE LA PLA ET DE LA PLL

L'approche que nous proposons au prochain chapitre pour estimer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des protéines globulaires nécessite l'identification des aires résiduelles où débutent et où prennent fin les transitions monocouche-bicouche sur les isothermes Π -A des homopolypeptides. La connaissance de la conformation que possèdent les homopolypeptides hydrophobes étudiés à l'interface air-eau s'avère tout aussi importante.

Ainsi, nous présentons au cours de ce chapitre une analyse des isothermes Π -A (section 4.1) et ΔV -A (section 4.3) de la PLA et de la PLL respectivement organisées majoritairement en hélice- α et en feuillet- β antiparallèle tel que nous l'avons déterminé à partir des spectres infrarouges de leur films Langmuir-Blodgett (section 4.2). Nous mettons en évidence, à la section 4.1 l'existence de transitions de phase inédites sur les isothermes Π -A de la PLA et de la PLL. Grâce à la modélisation de l'organisation de la

PLA et de la PLL (section 4.4) et de l'analyse des isothermes ΔV -A enregistrées, nous attribuons aux aires résiduelles où débutent ces transitions de phase inédites, le début des transitions monocouche-bicouche des deux homopolypeptides étudiés.

Avant de présenter les résultats que nous avons obtenus et leur analyse, nous faisons un bref retour sur les études antérieures concernant le comportement à l'interface air-eau d'homopolypeptides hydrophobes contenant de courtes chaînes latérales aliphatiques et organisées majoritairement en hélice- α et en feuillet- β .

Les isothermes Π -A d'homopolypeptides possédant de courtes chaînes latérales aliphatiques comme la PLA et organisés majoritairement en hélices- α montrent une transition de phase attribuée à une transition monocouche-bicouche (Malcolm, B. R. (1968 et 1973) et Gabrielli *et al.* (1981)). Les isothermes Π -A d'homopolypeptides hydrophobes organisés en feuillet- β montrent eux aussi une transition de phase associée à une transition monocouche-bicouche (Baglioni *et al.* (1982)). Contrairement à la discontinuité de l'aire résiduelle (plateau de Π) observée durant la transition monocouche-bicouche pour des homopolypeptides hydrophobes à longues chaînes latérales (chapitre 3), la transition monocouche-bicouche pour les homopolypeptides à courtes chaînes latérales aliphatiques majoritairement organisés en hélices- α et les homopolypeptides hydrophobes majoritairement organisés en feuillet- β est plutôt décrite par une inflexion

de la courbe Π -A ou un plateau incliné de Π (Malcolm, B. R. (1968 et 1973), Gabrielli *et al.* (1981) et Baglioni *et al.* (1982)). L'observation d'une telle inflexion sur une isotherme Π -A est caractéristique d'une transition de phase d'ordre second. En effet, une transition de phase d'ordre second est caractérisée par une discontinuité de l'inverse de la dérivé première $(d\Pi/dA)^{-1}$ de la courbe Π -A sans observer de discontinuité de l'aire résiduelle (Harkins, W. D. (1952)). Pour une inflexion ou un plateau incliné de Π , la pente $(d\Pi/dA)$ de la courbe Π -A est constante, l'inverse l'est aussi nécessairement. De plus, une transition de phase d'ordre second implique une miscibilité entre la phase originale retrouvée au début de la transition et la phase dans laquelle le film se transforme et que cette transition est graduelle (Denicourt, N. (1990) et les références qui y sont citées)).

4.1. Isothermes de pression de surface (Π) - aire résiduelle (A) de la PLA et de la PLL

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'utilisation du chloroforme comme solvant d'étalement favorise l'organisation en hélice- α à l'interface air-eau des homopolypeptides hydrophobes. Cependant, ce ne sont pas tous les homopolypeptides hydrophobes qui sont solubles dans le chloroforme. Ainsi, pour les solubiliser il faut souvent ajouter au chloroforme un certain pourcentage (vol:vol) d'acides organiques forts comme l'acide dichloroacétique et l'acide trifluoroacétique. L'utilisation d'un mélange de chloroforme et d'acide organique est nécessaire afin de solubiliser la PLA (Malcolm, B. R. (1968 et 1973) et Gabrielli *et al.*

(1981)) et la PLL (Malcolm, B. R. (1975)). D'autre part, il est reconnu depuis longtemps que ces acides organiques peuvent déstabiliser la conformation α -hélicoïdale des homopolypeptides hydrophobes en solution (Fasman, G. D. (1967)). Ainsi, l'obtention d'une conformation à 100 % α -hélicoïdale à l'interface air-eau lorsque les homopolypeptides hydrophobes y sont étalés à partir de solvants d'étalements contenant des acides organiques apparaît à première vue douteuse. En effet, les spectres FTIR-MIR de films Langmuir-Blodgett de la PLA que nous avons enregistrés (section 4.2) lorsque cette dernière fut étalée à l'interface à partir d'un mélange de chloroforme et d'acide dichloroacétique à 6 % (vol:vol) montrent la présence d'une certaine quantité de feuillet- β . De façon intéressante, nous verrons aussi que l'utilisation dans le solvant d'étalement de la PLL d'une importante proportion (20 %, vol:vol) d'acide trifluoroacétique nécessaire à sa solubilisation (Malcolm, B. R. (1975)) permet l'obtention d'un film presque exclusivement organisé en feuillet- β antiparallèle.

Nous présentons à la Fig. 24 les isothermes de pression de surface (Π) - aire résiduelle (A) que nous avons obtenues pour la PLA et la PLL. L'isotherme Π -A de la PLA que nous avons obtenue est de façon globale en accord avec celles obtenues par Gabrielli et ses collaborateurs et Malcolm dans des conditions expérimentales semblables (Gabrielli *et al.* (1981) et Malcolm, B. R. (1973)).

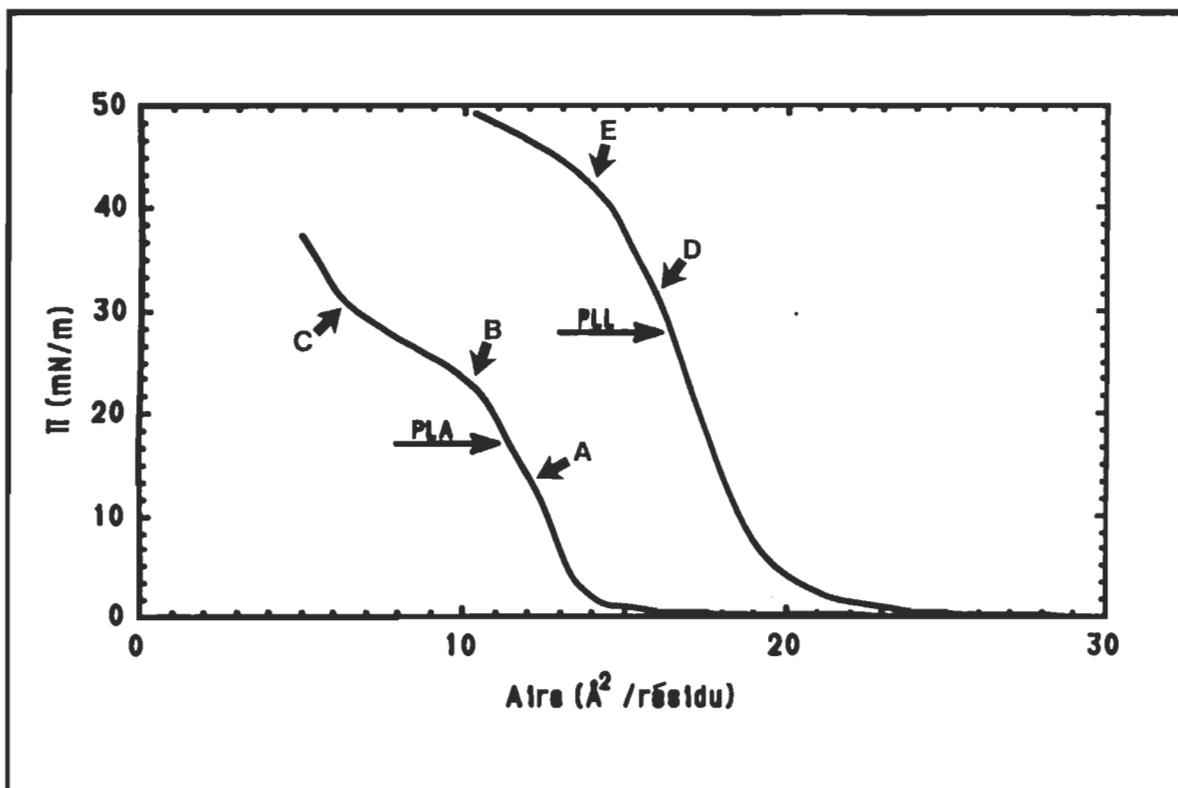


Figure 24. Isothermes Π -A obtenues pour la PLA (D.P. 265) et la PLL (D.P. 92). Sous-phase: eau bidistillée. Température: $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Les solvants d'étalement utilisés sont mentionnés dans le texte. La signification des différentes flèche apparaît aussi dans le texte.

Tout comme Gabrielli et ses collaborateurs et Malcolm, nous observons le point de décollement de Π vers une valeur de A d'environ $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Nous pouvons remarquer sur cette isotherme l'existence d'une transition de phase d'ordre second débutant vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche b, Fig. 24) pour prendre fin vers $6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche c, Fig. 24) avec le changement de courbure observé à cette valeur de A. C'est à cet endroit, vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, qu'on attribue normalement le début de la transition monocouche-bicouche de la PLA (Gabrielli *et al.* (1981) et Malcolm, B. R. (1973)). Par contre, par une analyse plus approfondie de l'isotherme que

nous avons obtenue, nous pouvons identifier une autre transition de phase débutant vers $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche a, Fig. 24) et se terminant vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche b, Fig. 24). Comme nous pouvons le constater, la pente de la courbe Π -A est constante sur cette plage d'aires résiduelles signifiant ainsi que cette transition est d'ordre second (Harkins, W. D. (1952)). Il est intéressant de noter, à ce stade, que l'aire résiduelle à la fin de la seconde transition ($6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) représente à peu près la moitié de l'aire résiduelle où est observé le début de la première transition *i.e.* vers $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Ce point sera discuté à la section 4.3.

Afin de mettre en évidence l'existence et le début de cette transition nous avons porté en graphique le module de compressibilité de l'isotherme de la PLA (κ , $\kappa = -A (d\Pi/dA)$, Gaines, G. L. (1966)) en fonction de A (Fig. 25). Comme le début de cette transition coïncide avec un changement apparent dans la courbure de l'isotherme (point d'inflexion) et que le module de compressibilité est proportionnel à la dérivée première de la courbe Π -A, le début de la transition devrait coïncider avec un maximum sur la Fig. 25. Effectivement, un maximum dans le module de compressibilité peut être observé vers $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ à la Fig. 25, montrant ainsi qu'une transition de phase d'ordre second débute à cette valeur d'aire résiduelle sur l'isotherme Π -A de la PLA. D'un autre côté, l'examen attentif des isothermes Π -A publiées par Gabrielli et collaborateurs et Malcolm permet de constater une inflexion dans leurs isothermes avant le début de la transition débutant vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$.

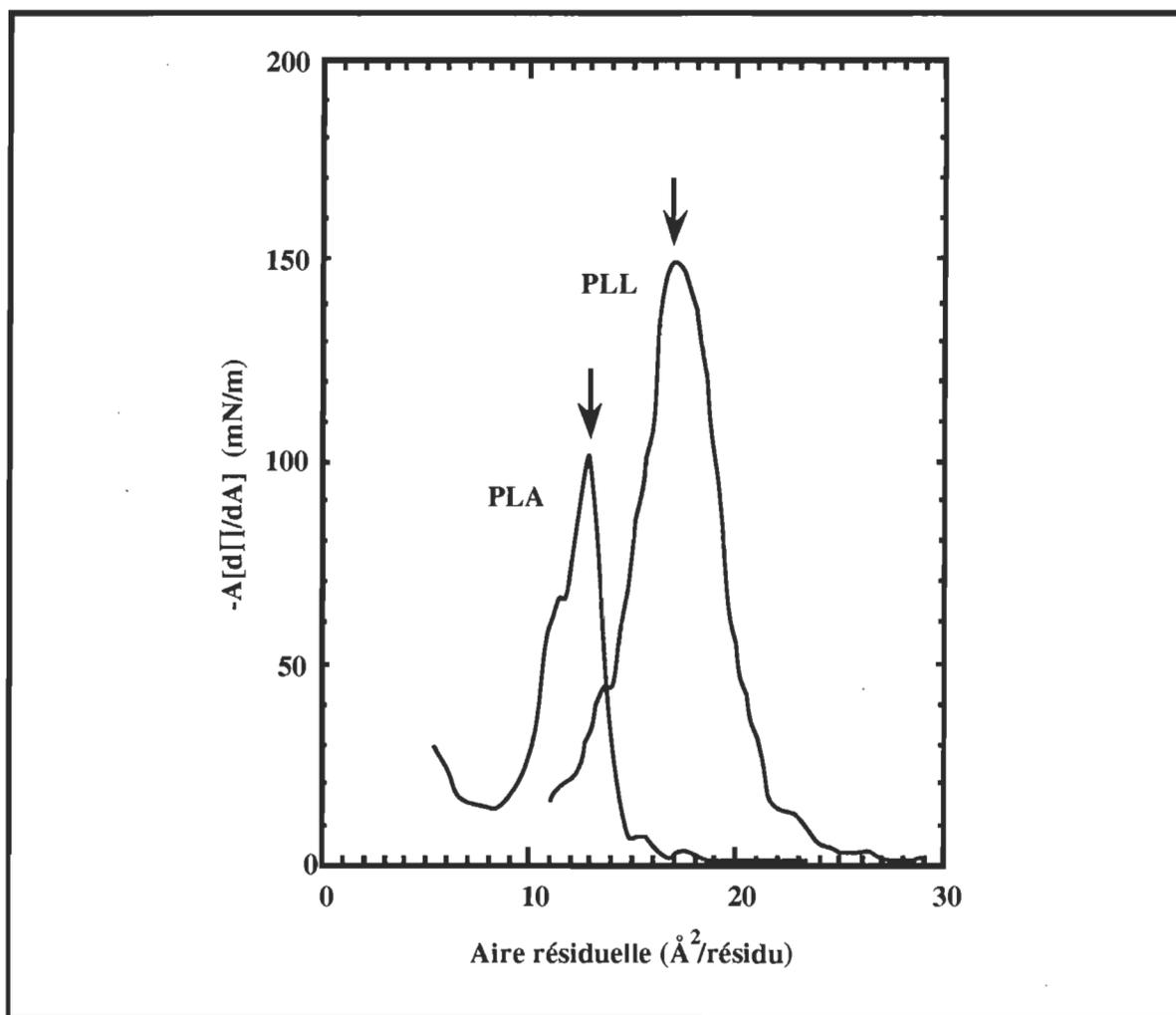


Figure 25. Graphique du module de compressibilité (κ , $\kappa = -A(d\Pi/dA)$) des films PLA et de PLL en fonction de A.

Ces auteurs ont probablement occulté l'existence de cette inflexion pour des raisons historiques. En effet, l'existence de deux transitions de phase d'ordre second implique que la transition monocouche-bicouche serait biphasique allant ainsi à l'encontre de l'idée préconçue d'une transition en

une seule étape (Malcolm, B. R. (1973 et 1985a)). Nous reviendrons à la section 4.3 sur la nature probable de ces deux transitions de phase.

Nous pouvons remarquer sur l'isotherme Π -A de la PLL que le décollement de Π survient à une valeur de A d'environ $24,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Nous pouvons aussi clairement remarquer le début d'une transition de phase d'ordre second vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche d, Fig. 24). Nous n'avons pu mesurer la fin de cette transition car les transducteurs utilisés ne donnaient plus de réponses linéaires à des tensions correspondant à des valeurs de Π supérieures à 50 mN/m . En conséquence, les valeurs de Π supérieures à 50 mN/m ne sont plus exactes. C'est pour cette raison que nous présentons une isotherme tronquée de la PLL. Cependant, à l'instar de la PLA, nous observons aussi sur l'isotherme Π -A de la PLL la présence d'une autre transition de phase d'ordre second débutant vers $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche e, Fig. 24) et prenant fin vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche d). De la même façon que pour la PLA, l'existence de cette transition est mise en évidence par l'identification d'un point d'inflexion situé vers $17,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ sur la Fig 25. On peut cependant constater un léger décalage d'environ un $\text{\AA}^2/\text{résidu}$ entre la position du point d'inflexion identifiable sur l'isotherme Π -A de la PLL (flèche e, Fig. 24) et le maximum sur le graphique du module de compressibilité (Fig. 25). Par contre en observant attentivement l'isotherme de la PLL il apparaît que ce changement de courbure sur l'isotherme Π -A de la PLL est bel et bien situé vers $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et non vers $17,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Ce léger décalage est probablement introduit par la méthode

numérique que nous avons utilisée pour calculer le module de compressibilité. Néanmoins, la Fig. 25 montre clairement qu'il existe une transition de phase supplémentaire à celle plus facilement identifiable et qui débute vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (flèche e, Fig. 24). Nous reviendrons sur les implications et la nature probable de ces deux transitions observées sur l'isotherme Π -A de la PLL à la section 4.3.

L'isotherme Π -A que nous avons obtenue pour la PLL ne correspond pas à l'isotherme mesurée par Malcolm (Malcolm, B. R. (1975)) avec le même solvant d'étalement (mélange de chloroforme et d'acide trifluoroacétique à 20% (vol:vol)). L'aire résiduelle du décollement de Π que nous mesurons, *i.e.* $24,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ est beaucoup plus élevée que celle mesurée par Malcolm. En effet, Malcolm observe un décollement de Π vers $17 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Il est possible que certaines différences subtiles entre la méthodologie employée par Malcolm et la nôtre puissent être à l'origine de cet important écart. Dans cet optique, Malcolm rapporte dans son travail qu'il a éprouvé des problèmes lors de l'étalement de la PLL en mentionnant que la solution s'agrippait à la pointe de sa seringue de verre. En conséquence, la quantité de PLL à l'interface était probablement surestimée donnant ainsi des aires résiduelles trop faibles. D'un autre côté, les valeurs de Π observées par Malcom sont de façon générale deux fois plus faibles que celles que nous observons. Cette différence entre notre isotherme et la sienne est plus difficilement explicable. Par contre, nous montrons à la section suivante que la PLL, dans notre étude, est majoritairement organisée

en feuillet- β antiparallèle tandis que Malcolm rapporte pour sa part une organisation en hélice- α à l'interface qu'il ne démontre pas par ailleurs. D'un autre côté, si la PLL était effectivement organisée en hélice- α à l'interface dans l'étude de Malcolm l'important écart entre les valeurs de Π qu'il rapporte et les nôtres peut, en première approximation, s'expliquer. En effet, pour un film de PLL organisée en feuillet- β , la transition monocouche-bicouche implique, en plus des autres interactions non-covalentes, le bris de liaisons-H inter-moléculaires absentes dans un film organisé en hélice- α . Ainsi, l'énergie nécessaire pour briser des interactions entre feuillets- β serait plus élevée que celle nécessaire au bris des interactions entre hélices- α pouvant ainsi expliquer pourquoi les pressions de surface que nous avons enregistrées sont plus élevées.

A partir de l'observation des deux transitions de phase d'ordre second sur les isothermes Π -A que nous avons obtenues, il apparaît que la transition monocouche-bicouche de la PLA et de la PLL soit biphasique. Nous verrons, à partir de l'étude des conformations respectives de ces polypeptides à l'interface (section suivante) et de la modélisation de leur organisation à l'interface (section 4.3), que les aires résiduelles où débutent les premières transitions rencontrées sur les isothermes Π -A correspondent à des aires résiduelles d'entassement limite de la PLA et de la PLL. De plus, nous observons sur les isothermes ΔV -A de la PLA et de la PLL que nous avons enregistrées, le début de pseudo-plateaux de ΔV aux mêmes valeurs de A où débutent les premières transitions. Comme nous le verrons à partir

de l'analyse du comportement de ΔV (section 4.4), l'observation de tels pseudo-plateaux de ΔV devrait aussi coïncider avec un entassement limite de la PLA et de la PLL en deux dimensions et ainsi avec le début de l'organisation tridimensionnelle des films de PLA et de PLL.

4.2 Conformation de la PLA et de la PLL à l'interface air-eau

Afin de déterminer la conformation de la PLA et de la PLL à l'interface air-eau, nous avons mesuré les spectres infrarouges de films Langmuir-Blodgett formés à différents points de leurs isothermes Π -A. Pour la PLA, nous avons mesuré les spectres infrarouges de films Langmuir-Blodgett formés vers 16,0, 12,0 et 6,5 Å²/résidu et pour la PLL nous avons mesuré les spectres infrarouges de films Langmuir-Blodgett formés à 24,0, et 17,0 Å²/résidu. De façon générale, nous avons observé que l'allure des spectres ne change pas en fonction de l'aire résiduelle à laquelle les films ont été transférés. Ce résultat indique qu'aucun changement conformationnel important ne survient en cours de compression. Nous remarquons cependant une augmentation de l'absorbance de la bande Amide I du simple au double du spectre du film de PLA transféré à 6,5 Å²/résidu, comparativement à l'intensité observée sur le spectre du film transféré vers 12 Å²/résidu. Ce résultat est en accord avec l'existence d'une bicouche de PLA pour une aire résiduelle de 6,5 Å²/résidu.

Nous présentons à la Fig. 26 la région des bandes Amides I et II des spectres infrarouges des films Langmuir-Blodgett de la PLA et de la PLL respectivement formé à 6,5 Å²/résidu et 17,0 Å²/résidu. Afin de déterminer la conformation de la PLA et la PLL, nous nous attarderons à la position des bandes Amides I qui couvrent la région spectrale de 1600-1700 cm⁻¹. La majorité des études sur la conformation des protéines et des polypeptidides par FTIR portent sur l'analyse de la position de la bande Amide I. La bande Amide I est très sensible à la conformation du squelette polypeptidique (Arrondo *et al.* (1993)). Comme nous l'avons vu au chapitre 2, cette bande correspond majoritairement à la fréquence de l'étirement des carbonyles du squelette polypeptidique et peut donc être modulée par la géométrie des liaisons-H des structures secondaires présentes (Krimm et Bandekar (1986)). Nous avons dressé une liste des fréquences caractéristiques pour les différentes structures secondaires au Tableau 3 du chapitre 2.

On peut remarquer sur la Fig. 26 que la bande Amide I de la PLA est centrée à 1658 cm⁻¹ indiquant que la PLA est majoritairement organisée en hélice- α . Nous pouvons aussi remarquer un épaulement observé vers 1630 cm⁻¹ nous indiquant ainsi qu'une faible fraction de la PLA est aussi organisée en feuillet- β . De plus, la présence d'une bande de faible intensité située vers 1730 cm⁻¹ attribuable à une bande carbonyle (étirement de la liaison carbonyle) pourrait être une indication d'une faible trace d'acide dichloroacétique dans les films de PLA.

Le spectre infrarouge que nous avons obtenu pour la PLA étalée à l'interface à partir d'un solvant d'étalement composé de chloroforme et d'acide dichloroacétique correspond à celui publié par Gabrielli et collaborateurs (Gabrielli *et al.* (1988)). Ces derniers observent également un épaulement vers 1630 cm^{-1}

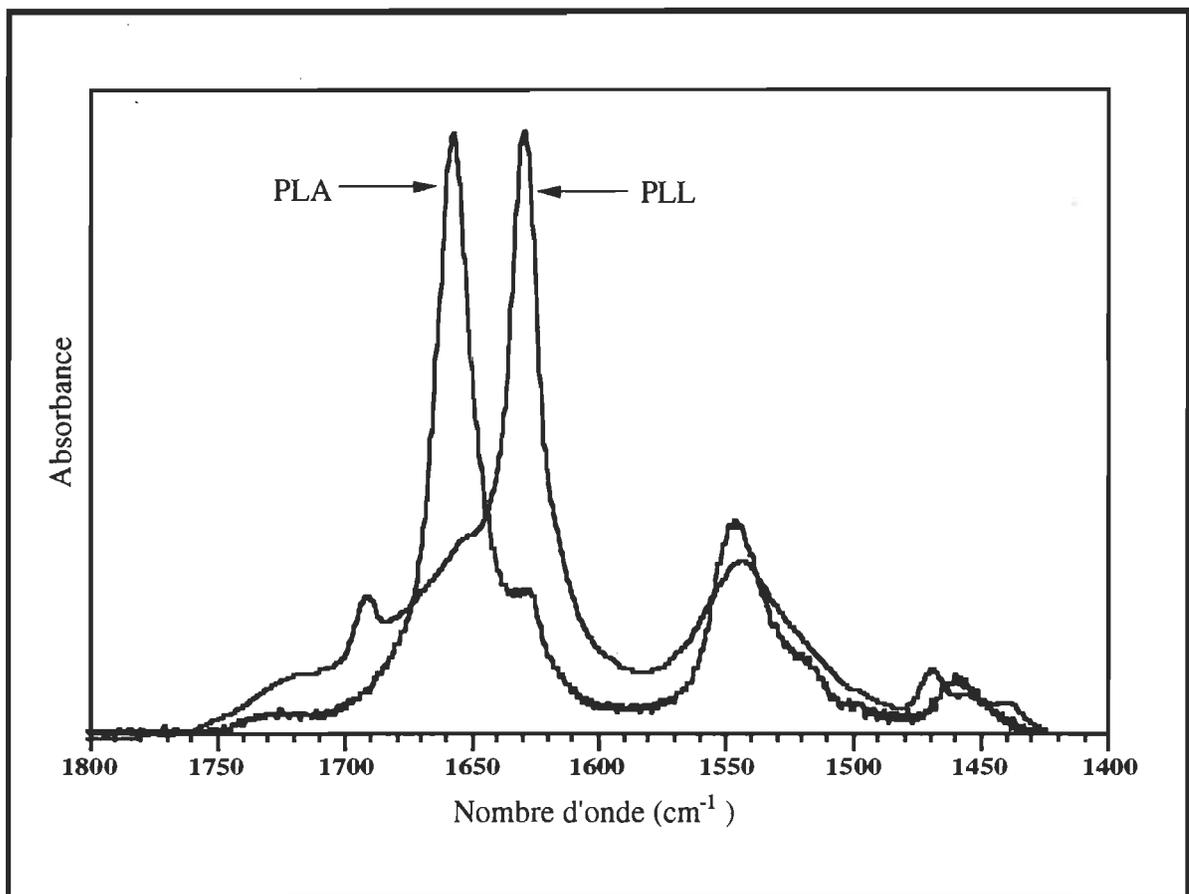


Figure 26. Région des bandes Amides I et II des spectres infrarouges enregistrés pour des films Langmuir-Blodgett de PLA et de PLL. Afin de distinguer les différences entre les deux spectres, l'absorbance des bandes Amide I fut normalisée. Les détails sont présentés dans le texte.

Il est cependant impossible de spécifier s'il s'agit de feuillet- β parallèle ou antiparallèle. La bande à 1690 cm^{-1} qui résulte de l'éclatement caractéristique de la bande Amide I pour le feuillet- β antiparallèle (chapitre 2) est trop faible pour aider à l'attribution. En effet, cette bande est environ dix fois moins intense que la bande principale centrée à 1630 cm^{-1} (Arrondo *et al.* (1993)).

D'un autre côté, nous devons nous poser la question à savoir si la présence d'une faible proportion de feuillet- β tel qu'indiquer sur les spectres infrarouges de la PLA est représentative de sa conformation à l'interface ou si cette légère proportion de feuillet- β est induite lors du transfert à partir de films à 100 % α -hélicoïdal. Par contre nous verrons plus loin dans cette section que l'acide dichloroacétique contenue dans le solvant d'étalement pourrait être à l'origine de l'existence d'une faible proportion de feuillets- β à l'interface.

Les spectres infrarouges des films Langmuir-Blodgett de la PLL que nous avons enregistrés sont typiques d'une organisation en feuillet- β antiparallèle. La bande Amide I principale est centrée à 1630 cm^{-1} et la bande Amide I secondaire de faible intensité située vers 1690 cm^{-1} sont caractéristiques du feuillet- β antiparallèle. Nous pouvons aussi remarquer la présence d'un épaulement vers 1655 cm^{-1} indiquant probablement la présence d'une faible proportion d'hélice- α . À notre connaissance aucun

autre spectre infrarouge de la PLL organisée en feuillet- β antiparallèle n'est présenté dans la littérature. Comme pour le cas de la PLA, une bande de faible intensité située vers 1720 cm^{-1} , aussi attribuable à une bande carbonyle (étirement de la liaison carbonyle), est observée et pourrait être une indication d'une faible trace d'acide trifluoroacétique dans les films de PLL.

Ce dernier résultat fut à première vue surprenant étant donné que Malcolm rapporte une organisation en hélice- α à l'interface air-eau lorsque la PLL y est étalée à partir d'un mélange de chloroforme et d'acide trifluoroacétique (20%) (Malcolm, B. R. (1975)).

L'organisation en feuillet- β antiparallèle de la PLL que nous observons peut s'expliquer en considérant la force de l'acide trifluoroacétique et la propriété qu'il aurait ainsi d'agir comme donneur et/ou accepteur (sous sa forme ionisée) de liaisons-H. Ainsi, l'acide trifluoroacétique contenu dans le solvant d'étalement de la PLL, déstabiliserait l'organisation α -hélicoïdale en formant des liaisons-H avec les groupements NH et CO du squelette polypeptidique prévenant ainsi la formation des liaisons-H intramoléculaire nécessaire à la stabilisation des hélices- α . Des études préliminaires en dispersion de la rotation optique (ORD, Creighton, T. E. (1993)) montrent que le degré d'hélicité des solutions de PLL est effectivement faible, *i.e.* inférieur à 30 %. D'un autre côté, l'effet déstabilisant de l'acide trifluoroacétique face à l'organisation en hélice- α

d'homopolypeptides hydrophobes est connu depuis longtemps (Fasman, G. D. (1967)). Il apparaît donc surprenant à première vue que Malcolm ait pu obtenir de l'hélice- α à l'interface air-eau à partir d'un solvant d'étalement composé à 20 % d'acide trifluoroacétique dans le chloroforme. Cependant, l'utilisation de l'acide trifluoroacétique est essentielle à la solubilisation de la PLL (Malcolm, B. R. (1975)). D'un autre côté, l'organisation de la PLL en feuillet- β antiparallèle nous offre l'opportunité de caractériser le comportement de polypeptides majoritairement en feuillets- β et en hélices- α (la PLA).

De la même façon que pour la PLL, la présence de feuillet- β dans les films de PLA peut s'expliquer par une déstabilisation moins importante des hélices de PLA causée par la présence d'une plus faible proportion (6 % vol:vol) d'un acide organique fort (l'acide dichloroacétique) dans le solvant d'étalement utilisé. En ce sens, des études préliminaires par ORD des solutions de PLA montrent que ces dernières ont un degré d'hélicité évalué à environ 80 %.

4.2.1 Estimation de la proportion des conformations présentes par simulation spectrale de la bande Amide I originale

Une estimation de la proportion des structures secondaires d'une protéine ou d'un polypeptide peut s'effectuer par la simulation des spectres FTIR dans la région de la bande Amide I originale (Arrondo *et al.* (1993) et Surewicz et Mantsch (1988) voir chapitre 2). Les paramètres nécessaires à

une telle simulation sont le nombre d'espèces contribuant au spectre composite (le nombre de bandes), leurs fréquences caractéristiques, l'intensité et la largeur de la bande à la mi-hauteur. Ces paramètres sont fournis à un programme (Grams 386) de simulation qui minimise de façon itérative la différence entre le spectre original et l'enveloppe résultant de la somme des bandes possédant les paramètres spécifiés. Les intensités intégrées (données par le programme) de chaque composante sont directement reliées à la proportion de chacune des structures secondaires présentes dans les échantillons (Arrondo *et al.* (1993) et Surewicz et Mantsch (1988)).

Nous avons simulé la région de la bande Amide I du spectre infrarouge de la PLA en monocouche Langmuir-Blodgett en considérant deux bandes, une centrée à 1658 cm^{-1} associée à l'hélice- α et la seconde centrée à 1630 cm^{-1} associée au feuillet- β . Quant à la forme des bandes simulées nous avons utilisé un mélange de profils Gaussien et de Lorentz (Arrondo *et al.* (1993)). En faits, le facteur de forme, exprimé en pourcentage de profil de Lorentz, fut laissé variable. Ce paramètre fut ajusté par itération par le programme de simulation. La forme d'une bande infrarouge contient de l'information quant à la population, les interactions et l'état physique dans lequel se trouvent les groupes exhibant un mode de vibration particulier (Arrondo *et al.* (1993)). Par contre, ces considérations concernant la forme des bandes infrarouges sont complexes et débordent l'utilisation qualitative que nous faisons des simulations spectrales des spectres infrarouges

enregistrés. Les résultats de la simulation sont présentés à la Fig. 27. Les paramètres des deux bandes considérées sont résumés au Tableau 5.

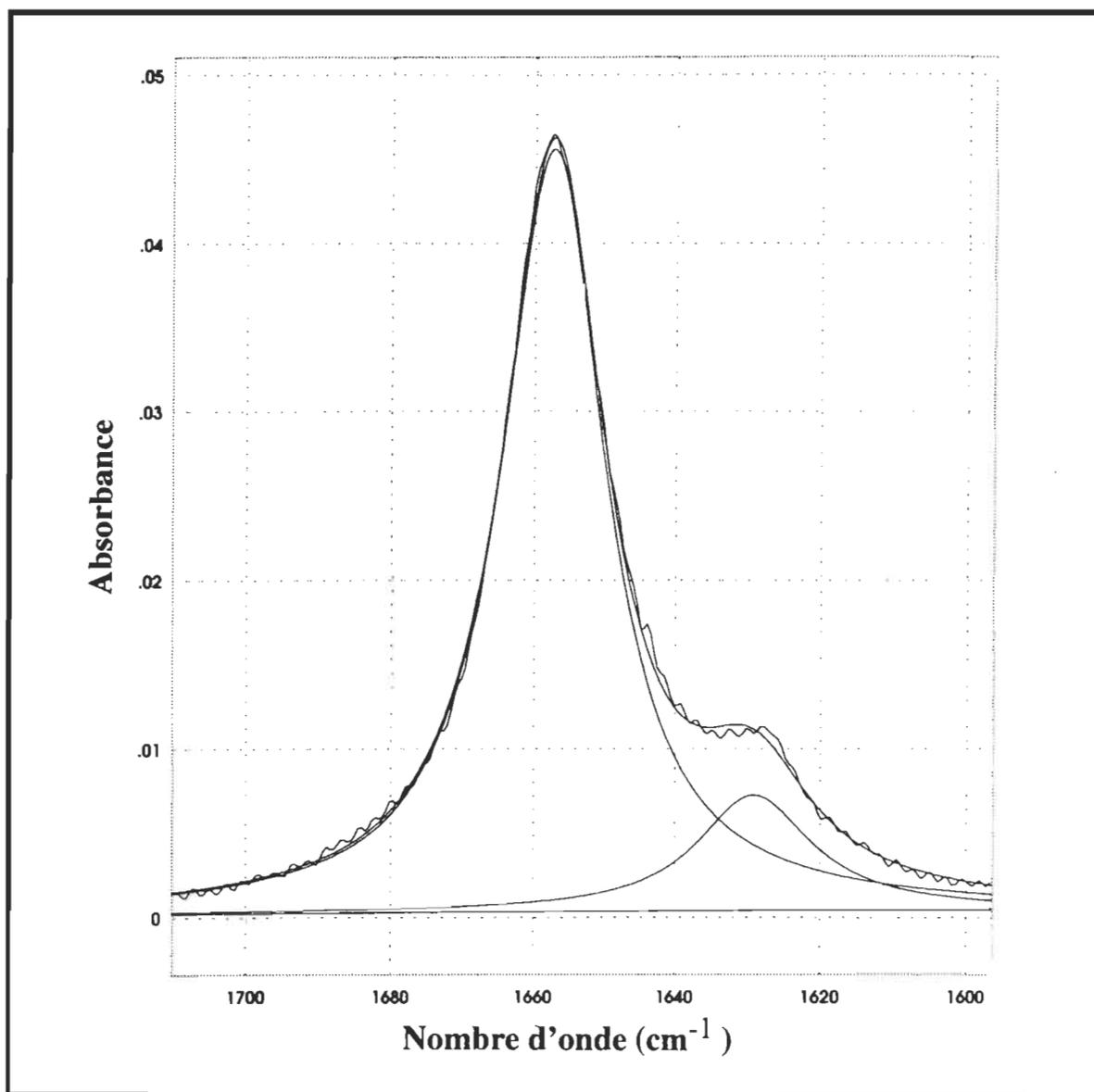


Figure 27. Simulation spectrale de la région de la bande Amide I du spectre FTIR-MIR de la PLA présenté à la Fig. 26. Les détails sont présentés dans le texte.

Les intensités intégrées nous permettent d'estimer que la PLA existe à l'interface air-eau sous forme d'un mélange constitué approximativement de 90 % d'hélice- α et de 10% de feuillet- β parallèle ou antiparallèle.

Tableau 5
Position (ν), intensité (I), intensité intégrée (A),
pleine largeur à mi-hauteur (τ) et forme des
deux composantes de la bande Amide I du spectre
infrarouge de la PLA obtenus par simulation spectrale.

Structure	ν (cm ⁻¹)	I	τ (cm ⁻¹)	Forme (%)	A(%)
Hélice- α	1658	0,0452	17	100	89
Feuillet- β	1629	0,0068	19	100	11

Nous présentons à la Fig. 28 les résultats de la simulation de la région de la bande Amide I du spectre infrarouge de la PLL. Les composantes situées à 1630 et 1690 cm⁻¹ sont attribuées au feuillet- β antiparallèle et la composante située à 1653 cm⁻¹ est attribuée à l'hélice- α . Une bande supplémentaire située à 1670 cm⁻¹ a été considérée dans la simulation. Cette bande est attribuable aux boucles- β (Surewicz et Mantsch (1988) et Krimm et Bandekar (1986)). Nous avons considéré cette bande supplémentaire car les résultats des simulations spectrales en l'absence de cette dernière donnaient une largeur de bande à mi-hauteur pour la bande à 1653 cm⁻¹ d'environ 50 cm⁻¹ ce qui est largement supérieur aux largeurs de bandes à mi-hauteur comprises entre 10 et 25 cm⁻¹ normalement acceptées pour les

bandes Amides I des différentes structures secondaires (Arrondo *et al.* (1993)).

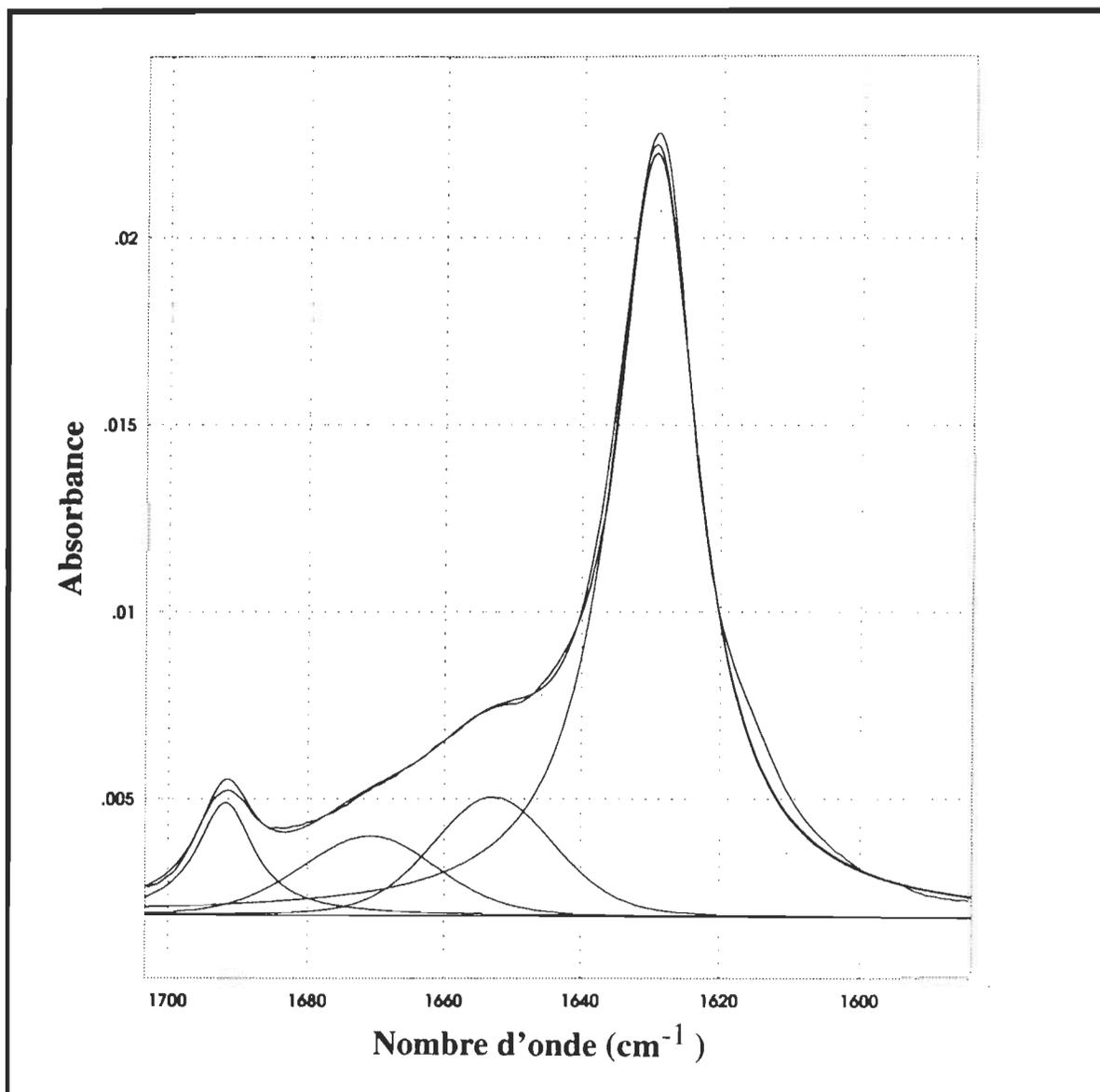


Figure 28. Simulation spectrale de la région de la bande Amide I du spectre infrarouge de la PLL présenté à la Fig. 26. Les détails sont présentés dans le texte.

De plus, sans cette bande centrée vers 1670 cm^{-1} , les simulations réduisaient de moitié l'intensité de la bande centrée vers 1630 cm^{-1} ce qui nous est apparu incohérent compte tenu de l'excellente définition de cette bande en vertu d'une largeur à mi-hauteur d'environ 20 cm^{-1} . D'un autre côté, en observant attentivement la région de la bande Amide I vers 1670 cm^{-1} , il est possible d'y remarquer un léger épaulement. L'utilisation d'une technique d'affinement spectral comme la déconvolution de Fourier (Arrondo *et al.* (1993)) aurait été nécessaire pour mettre en évidence plus clairement cet épaulement. Cependant, compte tenu du fait que nous nous servons des spectres infrarouge de la PLL seulement pour d'identifier les différentes espèces présentes dans les films, nous considérons à cet égard que l'analyse que nous en faisons au prochain paragraphe est satisfaisante. Les paramètres des quatre bandes simulées sont résumés au Tableau 6.

Tableau 6
Position (ν), intensité (I), intensité intégrée (A),
pleine largeur à mi-hauteur (τ) et forme des
composantes de la bande Amide I du spectre
infrarouge de la PLL obtenus par simulation spectrale.

Structure	$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	I	$\tau\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Forme (%)	A(%)
β anti.	1630	0,0225	15	100	74
β anti.	1692	0,005	10	100	6
Boucles- β	1670	0,003	23	20	9
Hélice- α	1653	0,005	21	20	11

À partir des intensités intégrées présentées au Tableau 6, nous pouvons évaluer la quantité de PLL organisée en hélice- α à 10 %. La somme des intensités intégrées des bandes situées à 1630 et 1690 cm^{-1} comptent pour 80 % de l'intensité intégrée totale. Ainsi nous pouvons approximer qu'environ 80 % des squelettes polypeptidiques de la PLL sont organisés en feuillets- β antiparallèles. L'intensité intégrée de la bande centrée à 1670 cm^{-1} compte pour 9 %. Il appert donc que les squelettes polypeptidiques de la PLL forment des liaisons-H inter- et intramoléculaires. En d'autres termes, la chaîne polypeptidique de la PLL sembler pouvoir se replier sur elle-même à l'interface. En première approximation, le degré de polymérisation de la PLL étant de 92 et la boucle- β impliquant quatre résidus, si l'on considère l'existence d'une boucle- β par chaîne polypeptidique, le rapport de l'intensité intégrée de la bande à 1670 cm^{-1} sur la somme des intensités intégrées des bandes à 1630, 1670 et 1690 cm^{-1} devrait donner environ 4 %. À partir du Tableau 6, nous pouvons approximer ce rapport à 10 % laissant ainsi présager la présence de deux boucles- β par chaîne polypeptidique. D'un autre côté, en considérant la nature approximative des pourcentages de structures secondaires évaluées à partir des intensités intégrées (Surewicz et Mantsch (1988), nous croyons que les résultats de la simulation ne peuvent servir qu'à proposer l'existence de telles boucles- β . De plus, le type de boucle présente est difficilement identifiable (chapitre 2).

4.3 Modélisation de l'organisation de la PLA et la PLL à l'interface air-eau

Dans cette section nous montrons que l'organisation de la PLA et de la PLL aux valeurs de A où sont observés les débuts des premières transitions sur les isothermes Π - A correspondent à des organisations limites d'entassement en deux dimensions. De plus, à partir de l'existence de deux transitions d'ordre second sur les isothermes Π - A , ainsi que nous l'avons discuté ci-dessus, il apparaît que les transitions monocouche-bicouche de la PLA et de la PLL se déroulent en deux étapes graduelles. Ainsi, il devrait exister un état intermédiaire entre la monocouche et la bicouche entre les deux transitions. Nous proposons alors un mécanisme en deux étapes pour les transitions monocouche-bicouche de la PLA et de la PLL de même que des organisations plausibles pour les états intermédiaires.

4.3.1 L'organisation de la PLA

Dans la section précédente, nous avons montré que la PLA est majoritairement organisée en hélice- α . De plus, il fut montré par Malcolm (Malcolm, B. R. (1968 et 1973)) que l'axe principale des hélices de PLA est parallèle à la barrière mobile. Ainsi, en divisant par la translation d'un résidu ($1,5 \text{ \AA}/\text{résidu}$) la valeur de A au début de la première transition ($12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$), nous obtenons la distance inter-hélices pour une organisation de la PLA à 100% en hélice- α au début de la première transition. Cette distance inter-hélices vaut $8,33 \text{ \AA}$. Il est intéressant de noter que cette valeur

correspond très bien avec la distance inter-hélices de 8,5 Å déterminée par diffraction des rayons-X des fibres orientées d'hélice- α de PLA (Fasman, G. D. (1967)).

Cette valeur de distance inter-hélices implique une organisation interdigitée des hélices- α de PLA au début de la transition. Ainsi que nous l'avons présenté au chapitre 3 (Fig.12), la distance entre deux hélices pour une organisation interdigitée est donnée par la somme du rayon externe effectif et du rayon interne effectif des hélices- α . Le rayon externe effectif de l'hélice- α de PLA peut être approximé par la distance entre le C β de la chaîne latérale et l'axe de l'hélice à laquelle nous ajoutons la valeur du rayon de van der Waals pour un atome de C aliphatique. La distance entre le C β et l'axe de l'hélice est 3,2 Å (chapitre 3, Fig. 13) et le rayon de van der Waals pour un atome de C aliphatique est 2,1 Å (Chou *et al.* (1983)). Le rayon externe effectif d'une hélice- α de PLA peut donc être approximé à 5,3 Å. En utilisant la valeur minimale que peut prendre le rayon interne effectif d'une hélice- α soit 2,9 Å (chapitre 3, Tableau 4) il est possible de calculer une distance inter-hélices pour des hélices- α de PLA interdigitées de 8,2 Å. En considérant le fait que la valeur de rayon interne effectif que nous utilisons est une valeur minimale, l'accord entre la valeur que nous calculons et la valeur observée nous apparaît suffisant pour proposer que les hélices sont effectivement interdigitées.

Une autre façon de mettre en évidence l'interdigitation des hélices de PLA est de calculer la distance inter-hélices pour des hélices côte-à-côte. Pour une telle organisation, la distance inter-hélices est donnée par le diamètre effectif de l'hélice (chapitre 3, Fig. 12). Le diamètre effectif d'une hélice- α de PLA est d'environ 10,6 Å, soit deux fois la valeur du rayon externe effectif (5,3 Å). L'aire résiduelle correspondant à une organisation côte à côte d'hélice- α de PLA est donc d'environ 15,9 Å²/résidu (10,6 Å x 1,5 Å/résidu). Cette valeur est nettement plus élevée que la valeur observée de 12,5 Å²/résidu au début de la première transition. Ceci montre qu'une organisation côte à côte des hélices ne peut exister et que les hélices de PLA doivent être interdigitées.

D'un autre côté, nous sommes à même de constater que la valeur d'aire résiduelle calculée pour une organisation côte à côte des hélices- α de PLA (15,9 Å²/résidu) correspond très bien à la valeur d'aire résiduelle observée au point de décollement de Π sur son isotherme Π -A (Fig. 24). Ainsi, il apparaît qu'entre le point de décollement de Π et le début de la première transition que les hélices- α de PLA s'interdigitent graduellement.

Toutefois, comme les films de PLA contiennent approximativement 10 % de feuillets- β antiparallèle et/ou parallèle, nous devons donc en tenir compte dans la modélisation de l'organisation de la PLA à l'interface air-eau. De la même façon que pour les hélices- α , nous considérerons que l'axe principal des brins- β est orienté perpendiculairement à la direction de la

compression et parallèle à la surface. Une telle organisation à l'interface air-eau pour un film d'homopolypeptides hydrophobes organisé en feuillet- β a déjà été observée (Cornell, D. G. (1979)). De plus, en première approximation, nous pouvons considérer que l'aire résiduelle d'un mélange d'hélices- α et de feuillets- β de PLA devrait être égale à la somme des aires résiduelles calculées pour les deux conformations pondérée par la fraction molaire de chacune. De la même façon que pour une hélice- α , l'aire d'un résidu dans un brin- β peut être calculer à partir de la distance inter-brin et la translation d'un résidu selon l'axe du brin (voir Fig. 3). La distance entre deux brins d'un feuillet- β antiparallèle de PLA et la translation par résidu selon l'axe du brin furent mesurées par diffraction des rayons-X à 4,70 Å et 3,45 Å/résidu, respectivement (Krimm et Bandekar (1986)). On peut donc calculer une aire résiduelle pour un brin- β dans un feuillet- β antiparallèle de PLA égale à 16,2 Å²/résidu (4,70 Å x 3,45 Å/résidu). L'aire résiduelle dans un feuillet- β parallèle devrait être un peu plus faible. En effet, la distance inter-brin dans un feuillet- β parallèle est sensiblement la même que pour un feuillet- β antiparallèle mais la translation selon l'axe du brin est un peu plus faible soit environ 3,25 Å/résidu (Salemme, F. R. (1983)). Ainsi l'aire résiduelle d'un résidu Alanine dans un feuillet- β parallèle de PLA peut être approximée à environ 15,3 Å²/résidu. Nous pouvons donc constater que l'aire résiduelle de la PLA organisée en feuillet- β est tout à fait comparable à l'aire résiduelle calculée pour des hélices- α côte à côte. Ainsi, l'aire résiduelle d'un mélange d'hélices- α côte à côte et de feuillets- β

parallèle ou antiparallèle sera toujours voisine de $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ indépendamment de la fraction molaire de chacune des conformations.

En tenant compte toujours des fractions molaires de PLA organisée en feuillet- β et en hélice- α , nous pouvons calculer l'aire résiduelle pour un mélange d'hélices interdigitées et de feuillet- β . Pour ce calcul, nous utiliserons la distance inter-hélices déterminée par les expériences de diffraction soit $8,5 \text{ \AA}$ et l'aire résiduelle résultante de $12,8 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Comme nous l'avons mentionné à la section 4.2, il est impossible de trancher entre une organisation parallèle ou antiparallèle des brins pour la fraction de PLA organisée en feuillet- β . Alors, si la fraction molaire de PLA organisée en feuillet- β l'est sous forme de feuillet- β antiparallèle, nous pouvons calculer une aire résiduelle de mélange égale à $13,1 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ ($0,9 \cdot (12,8 \text{ \AA}^2/\text{résidu}) + 0,1 \cdot (16,2 \text{ \AA}^2/\text{résidu})$). Si la fraction molaire de PLA organisée en feuillet- β l'est sous forme de feuillet- β parallèle, nous pouvons dans ce cas calculer une aire résiduelle de mélange égale à $13,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ ($0,9 \cdot (12,8 \text{ \AA}^2/\text{résidu}) + 0,1 \cdot (15,2 \text{ \AA}^2/\text{résidu})$). L'écart entre la valeur calculée et la valeur observée de $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ au début de la première transition n'est que d'environ 4 %, à peine plus élevé que l'erreur relative d'environ 2 % ($\pm 0,3/12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) sur l'aire résiduelle au début de la première transition. Ainsi, les calculs d'aires résiduelles que nous venons d'effectuer montrent clairement que l'entassement en deux dimensions des molécules de PLA au début de la première transition est

optimal. Il apparaît donc logique que le film de PLA commence à s'organiser en bicouche pour des valeurs de A inférieures à $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$.

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, l'interdigitation des hélices- α résulte normalement en une déformation des hélices pouvant mener à la formation de super-hélices ou à l'existence d'un angle de 20° entre leurs axes. Cependant, l'analyse des patrons de diffraction des rayons-X des fibres orientées de PLA montre clairement que les hélices- α de PLA peuvent tout aussi bien s'interdigiter tout en demeurant alignées parfaitement (Fasman, G. D. (1967)). Il fut démontré, en effet, qu'une légère déformation périodique des hélices de PLA aux endroits où une non-complémentarité des surfaces des hélices de PLA existe (à cause de leur nombre de résidus par tour non-entier) permettait une interdigitation tout en gardant les hélices mutuellement alignées (Fasman, G. D. (1967)). De plus, à cause de la petite taille de la chaîne latérale de l'Alanine la déformation des hélices de PLA est de faible amplitude et donc d'un faible coût énergétique (Fasman, G. D. (1967)). Dans la situation qui nous intéresse ici, il est tout à fait plausible que les hélices de PLA à l'interface air-eau soient interdigitées sans nécessairement que cela conduise à la formation de super-hélices. Nous montrons néanmoins à l'Annexe A que l'existence de super-hélices à deux brins de PLA à l'interface air-eau peut être modélisée d'un point de vue géométrique.

La Fig. 29a montre une représentation schématique de l'organisation du film de PLA au début de la transition monocouche-bicouche. Le film est fait de 90 % d'hélices- α interdigitées dans le plan de l'interface et environ 10 % de molécules organisées en feuillet- β . Bien entendu, nous reconnaissons sur ce schéma les hélices- α qui sont représentées, de la même façon qu'à la Fig. 12, par les deux cercles concentriques avec l'axe principal perpendiculaire au plan de la feuille.

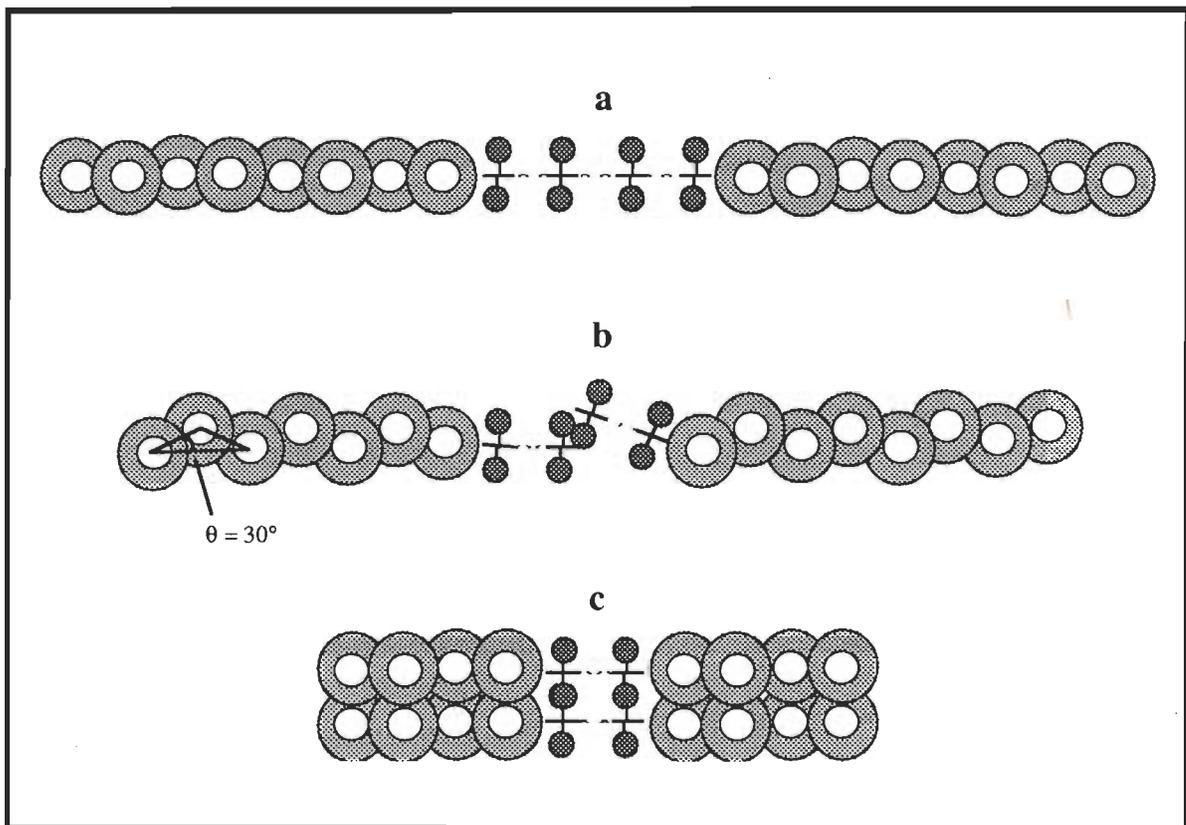


Figure 29. a- Représentation schématique de l'organisation du film de PLA au début de la transition monocouche-bicouche ($12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$). b- Organisation schématique de l'état intermédiaire dont nous proposons l'existence vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. c- Organisation schématique de la bicouche ($6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$).

Les brins- β ont eux aussi leur axe principal pointant dans la même direction. Les traits horizontaux représentent la liaison peptidique des brins, les boules représentent les chaînes latérales et les pointillées les liaisons-H inter-brins (Fig. 3).

Compte tenu qu'elle est d'ordre second, la première transition débutant à $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ doit se dérouler de façon graduelle. Ainsi que nous le schématisons, la première transition observée sur l'isotherme Π -A de la PLA pourrait correspondre à l'exclusion graduelle de la surface aqueuse des molécules qui formeront la seconde couche, et ce, jusqu'à l'obtention d'un état intermédiaire entre la monocouche et la bicouche (Fig 29b) vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (a, Fig. 24). En considérant seulement la fraction organisée en hélice- α , cette dernière valeur d'aire résiduelle peut s'expliquer par l'existence d'un angle de 30° entre les segments reliant les hélices voisines et le plan de la surface, tel que schématisé à la Fig.29b. En effet, la distance inter-hélices moyenne dans le plan de la surface pour un tel état intermédiaire peut être calculée par la projection dans le plan de la surface des segments reliant les axes des hélices voisines. Si la distance entre les hélices voisines est la même que pour l'état monomoléculaire (*i.e.* $8,5 \text{ \AA}$) et que l'angle défini par les segments reliant les hélices voisines et le plan de la surface vaut 30° , il est possible de calculer une distance inter-hélices moyenne de $7,0 \text{ \AA}$ ($8,5 \text{ \AA} \cos 30^\circ$) et une aire résiduelle correspondante de $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Ainsi, cet angle d'environ 30° pourrait correspondre à

l'élévation nécessaire pour que les hélices qui formeront la seconde couche quittent la surface aqueuse.

Ainsi, la seconde transition de phase d'ordre second observée sur l'isotherme Π -A de la PLA (*i.e.* entre 10,5 Å²/résidu et 6,5 Å²/résidu) devrait correspondre à la formation de la bicouche et durant laquelle de nouvelles interactions hélice-hélice, hélice-feuillet (non montrées) et feuillet-feuillet seraient graduellement formées à la suite de l'éjection (transfert) de résidus de l'interface vers la bicouche mixte. La Fig. 29c montre une organisation schématique d'une bicouche mixte. Etant donné que l'aire résiduelle à la fin de la seconde transition est de 6,5 Å²/résidu, soit la moitié de l'aire résiduelle calculée pour le film monomoléculaire mixte qui est de 13,0 Å²/résidu, une telle organisation de la bicouche nous apparaît vraisemblable.

La modélisation exacte de l'aire résiduelle de l'état intermédiaire de la PLA proposé à la Fig. 29b devrait inclure la fraction organisée en feuillet- β . Mais comme cette fraction ne compte que pour approximativement 10 % de la totalité, l'aire résiduelle calculée pour l'état intermédiaire, en ne considérant qu'une organisation α -hélicoïdale de la PLA, est une valeur réaliste. De plus, comme nous le discutons plus loin, il est possible que la première transition n'implique que la fraction organisée en hélices- α . D'un autre côté, comparativement à des hélices- α , il est géométriquement difficile de modéliser l'aire résiduelle pour des molécules organisées en

feuille- β en trois dimensions durant la transition, sauf pour cas trivial de la bicouche. De plus, la formation de la bicouche pour la fraction organisée en feuille- β implique-t-elle des feuillets à deux brins tel que nous le schématisons à la Fig. 29b? En fait il est impossible de le savoir. Par contre, il est possible d'imaginer un mécanisme plausible pour la formation d'une bicouche de feuillets- β en deux étapes, telle que schématisée aux Figures 29 b et c. La première étape pourrait correspondre au bris de liaisons-H nécessaire à l'éjection de la surface aqueuse d'une fraction des résidus. La seconde étape, s'initiant à partir de l'état intermédiaire, pourrait correspondre au "glissement" sur les feuillets demeurant à la surface des feuillets qui formeront la seconde couche.

Cependant, la possibilité que les deux transitions n'impliquent pas simultanément les deux conformations apparemment présentes dans les films de PLA doit être envisagée. Dans cet optique, si la première transition observée sur l'isotherme Π -A de la PLA représentait la transition monocouche-bicouche de la fraction organisée en feuille- β et qu'il s'agissait de feuillets- β antiparallèle, la diminution d'aire résiduelle correspondante devrait être d'environ $0,81 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ ($0,1 \times 16,2 \text{ \AA}^2/\text{résidu}/2$). Compte tenu de la diminution d'aire résiduelle d'environ $2,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ entre le début ($12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) et la fin ($10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) de la première transition, cette dernière ne peut correspondre à la transition monocouche-bicouche de la fraction molaire de la PLA organisée en feuille- β . D'un autre côté, il est possible que la transition monocouche-bicouche de la fraction molaire de la

PLA organisée en feuillet- β débute à une pression de surface plus élevée *i.e.* au début de la seconde transition. Ainsi, la première transition pourrait n'impliquer que la fraction organisée en hélices- α .

Cependant, le but de ce travail est d'obtenir la différence d'énergie libre entre des monocouches et des bicouches d'homopolypeptides hydrophobes. Comme l'énergie libre est une fonction thermodynamique d'état, la différence d'énergie libre entre la bicouche et la monocouche ne dépend pas du mécanisme exact de la transition. La connaissance des aires résiduelles où débute (état initial) et prend fin (état final) la transition monocouche-bicouche est suffisante.

4.3.2 L'organisation de la PLL

Comme nous l'avons estimé à la section 4.2.1, approximativement 80% des molécules de PLL sont organisées en feuillets- β antiparallèles avec environ 10 % des résidus organisés en boucles- β et environ 10 % en hélice- α . Donc, la PLL peut être considérée comme étant organisée à 90 % en feuillets- β antiparallèles à deux et/ou trois brins (voir section 4.2.1). Comparativement à un feuillet- β antiparallèle de PLA, la distance inter-brins pour un feuillet- β antiparallèle de PLL est légèrement supérieure d'environ 0,1 Å (Ashida *et al.* (1981)). En considérant une translation de 3,45 Å/résidu (Salemme, F. R. (1983)) nous pouvons approximer l'aire résiduelle d'un film de PLL strictement organisé en feuillet- β antiparallèle à environ 16,6 Å²/résidu (4,8 Å x 3,45 Å/résidu). Il est intéressant de noter

qu'à 4 % près, cette valeur correspond à la valeur d'aire résiduelle observée au début de la première transition de phase sur l'isotherme Π -A de la PLL, observée vers 16,0 Å²/résidu (e, Fig. 24).

En négligeant la fraction de la PLL organisée en hélice- α , nous pouvons estimer une distance inter-brins moyenne au point de décollement de Π , observé à une aire résiduelle de 24 Å²/résidu (Fig. 24), d'environ 7,0 Å (24,0 Å²/résidu / 3,45 Å/résidu) pour la fraction organisée en feuillet- β . Comme la distance inter-brins dans un feuillet- β antiparallèle de PLL est de 4,8 Å, il apparaît que les liaisons-H inter-feuillets ne sont pas toutes optimisées au point de décollement de Π .

Nous considérons maintenant la fraction de PLL organisée en hélice- α estimée à 10 % dans les calculs de A. Pour approximer l'aire résiduelle de la fraction de PLL organisée en hélice- α nous calculons le rayon externe d'une hélice- α de PLL pour une organisation étendue des chaînes latérales ($\chi^1 = \chi^2 = \chi^3 = 180^\circ$, Fig. 30). Le choix d'une conformation étendue est arbitraire mais il permet du moins de considérer un cas limite. D'un autre côté, il est impossible de connaître la conformation exacte des chaînes latérales de la PLL et la nature des atomes en contact.

La valeur de $D_{\alpha i}$, (Fig. 13) *i.e.* la distance entre le C $^\alpha$ et l'atome d'hydrogène le plus éloigné marqué par la flèche sur la Fig.30, fut estimée

géométriquement à 4,8 Å à partir des angles et des longueurs de liaisons fournies par Momany et collaborateurs (Momany *et al.* (1975)).

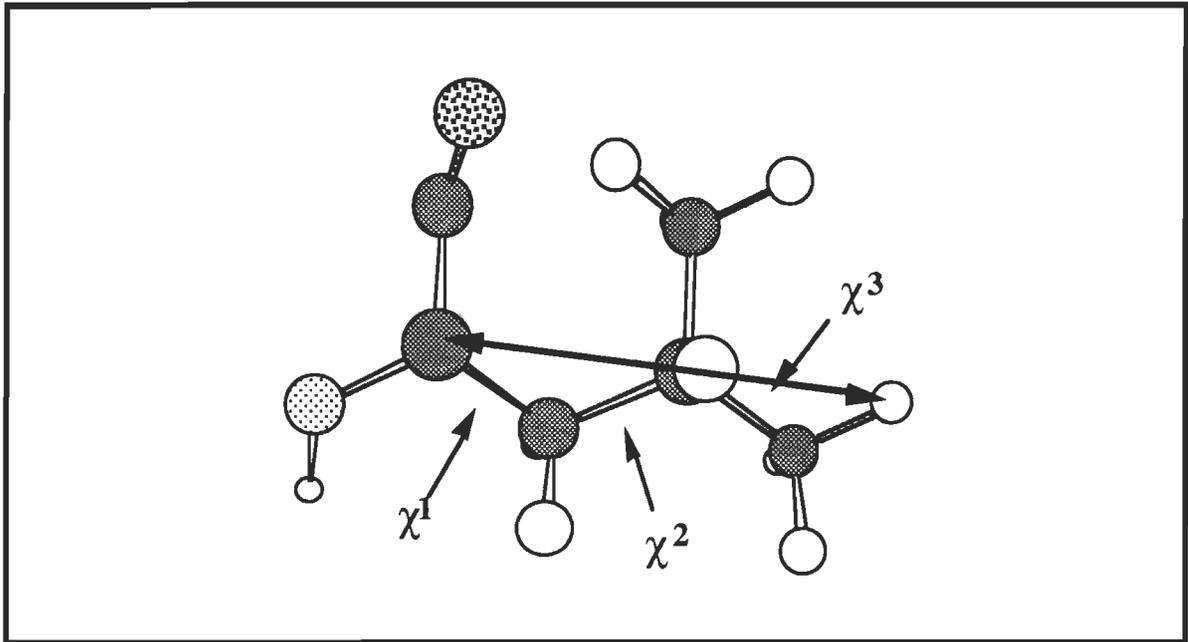


Figure 30. Représentation schématique d'un résidu Leucine dans une hélice- α avec une conformation étendue de la chaîne latérale ($\chi^1 = \chi^2 = \chi^3 = 180^\circ$).

Les valeurs de θ et β ont été respectivement évaluées à 85° et 127° . À l'aide de la relation 3.1 on peut donc calculer une valeur de D_i (la distance entre l'axe de l'hélice et l'atome d'hydrogène le plus éloigné) égale à 6,4 Å. En ajoutant une valeur de rayon de van der Waals de 1,46 Å pour un atome d'hydrogène aliphatique (Tableau 4, Chou *et al.* (1983)) on obtient une valeur de rayon externe effectif de 7,9 Å et un diamètre effectif de 15,8 Å. Ainsi, pour une organisation côte à côte des hélices de PLL, nous calculons une aire résiduelle de 23,7 Å²/résidu (15,8 Å x 1,5 Å/résidu). Cette aire résiduelle calculée pour une organisation côte à côte des hélices- α de PLL

n'est pas sans rappeler l'aire résiduelle où est observé le point de décollement de Π sur l'isotherme Π -A de la PLL, *i.e.* $24,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Ainsi, au point de décollement de Π , l'organisation du film de PLL pourrait correspondre à un mélange d'hélices- α côte à côte et de feuillets- β à deux ou trois brins avec des liaisons-H inter-feuillets non optimisées. Alors, le travail de compression entre le point de décollement de Π et le début de la première transition correspondrait au travail qui serait nécessaire pour orienter les feuillets- β de telle sorte que les liaisons-H inter-feuillets soient optimisées.

En tenant compte des fractions molaires de la PLL, l'aire résiduelle d'un mélange d'hélices- α côte à côte et de feuillets- β antiparallèles entassés de façon optimale peut être calculée à $17,3 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ ($0,1*(23,7\text{\AA}^2/\text{résidu}) + 0,9*(16,6 \text{ \AA}^2/\text{résidu})$). Cette aire résiduelle de mélange est significativement plus élevée que l'aire résiduelle du début de la première transition qui est environ $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (Fig. 24 (flèche d) et Fig. 25). Cependant, il s'agit d'une limite supérieure. En effet, les contacts inter-hélices peuvent s'effectuer *via* d'autres atomes moins éloignés de l'axe des hélices. De plus, les hélices peuvent s'interdigiter, diminuant ainsi la distance inter-hélices. Nous devons considérer l'aire résiduelle que prendrait la fraction des molécules de PLL en hélice- α pour une organisation complètement interdigitée. Comme nous l'avons montré à la Fig. 12, la distance inter-hélices pour des hélices complètement interdigitées est donnée par la somme du rayon interne effectif et du rayon externe

effectif. En utilisant une valeur de rayon interne effectif de 2,9 Å (chapitre 3, Tableau 2) et la valeur de rayon externe effectif de 7,9 Å que nous avons estimée ci-dessus, nous pouvons approximer la distance inter-hélices pour des hélices complètement interdigitées à 10,8 Å. L'aire résiduelle correspondante est de 16,2 Å²/résidu (10,8 Å x 1,5 Å/résidu). Ainsi, l'aire résiduelle d'un mélange d'hélices- α de PLL complètement interdigitées et de feuillets- β antiparallèles entassés de façon optimale peut être estimée à 16,6 Å²/résidu ($0,1 \cdot (16,2 \text{ Å}^2/\text{résidu}) + 0,9 \cdot (16,6 \text{ Å}^2/\text{résidu})$). Il apparaît donc que l'entassement bidimensionnelle de la PLL, au début de la première transition (environ 16,0 Å²/résidu), est optimal et que la transition monocouche-bicouche devrait logiquement y être initiée.

Nous présentons à la Fig. 31a une représentation schématique de l'organisation du film de PLL au début de la transition monocouche-bicouche (16,0 Å²/résidu). La fraction des résidus de la PLL qui est organisée en boucles- β n'est pas représentée dans les schémas. D'une part, parce qu'elle est difficilement modélisable et d'autre part parce que nous ne sommes pas en mesure de spécifier le ou les types de boucles présents à l'interface. D'un autre côté, comme leur proportion n'est que d'approximativement 10 %, leur omission dans la modélisation ne change en rien la conclusion principale que nous tirons, à savoir que la transition monocouche-bicouche doit être initiée au début de la première transition.

De la même façon que pour la fraction de PLA organisée en feuillet- β , nous pouvons imaginer un mécanisme de transition monocouche-bicouche en deux étapes pour la PLL organisée en feuillet- β . La première étape, entre 16,0 et 14,0 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$, pourrait correspondre au bris des liaisons-H inter-feuillets nécessaire à l'éjection graduelle de la surface aqueuse d'une fraction des résidus jusqu'à l'obtention d'un état intermédiaire entre la monocouche et la bicouche tel que présenté à la Fig 31b.

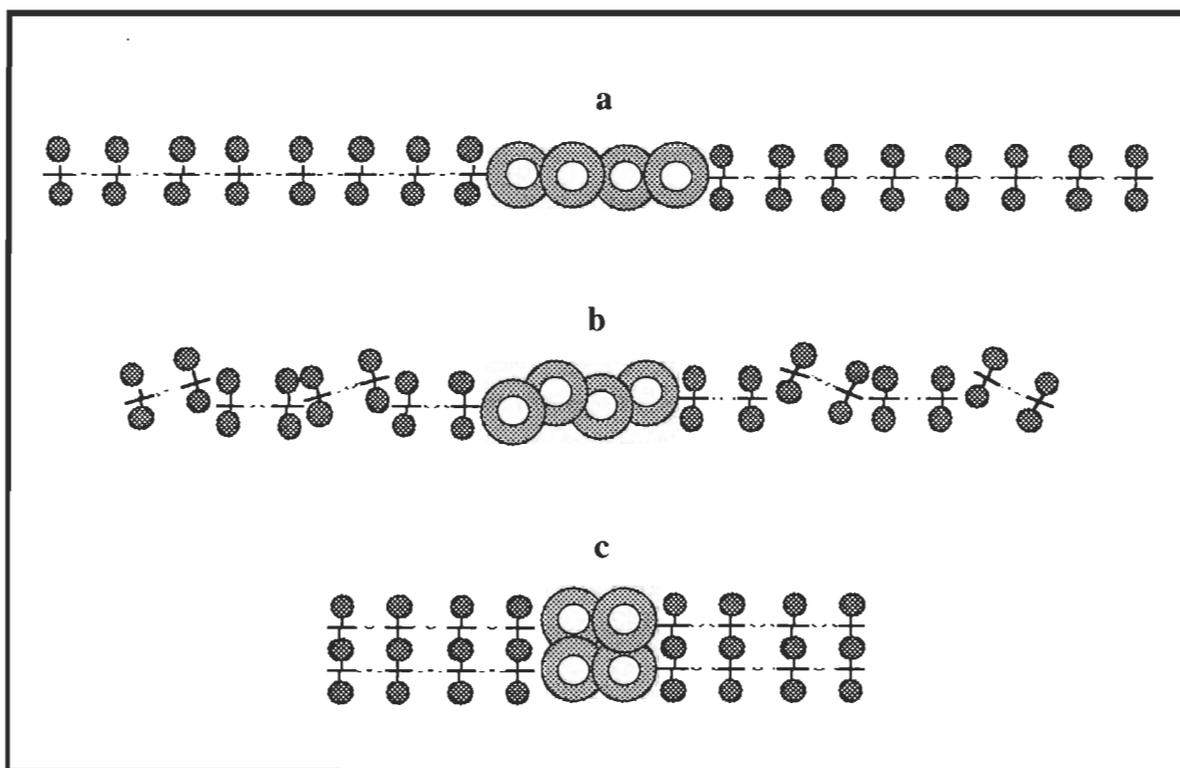


Figure 31. a- Représentation schématique de l'organisation du film de PLL au début de la transition monocouche-bicouche (16,0 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$). b- Organisation schématique de l'état intermédiaire dont nous proposons l'existence vers 14,0 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$. c- Organisation schématique de la bicouche.

Cet état intermédiaire, dont nous proposons l'existence vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, se veut plutôt une représentation schématique qu'un modèle précis. En effet, comme nous l'avons discuté précédemment, sauf pour le cas trivial d'une bicouche, il est géométriquement difficile de modéliser l'aire résiduelle pour des feuillets- β en trois dimensions. De plus, la transition monocouche-bicouche implique-t-elle le transfert de feuillets à deux et/ou à trois brins? Il est très difficile de trancher cette question. D'un autre côté, ainsi que nous l'avons discuté ci-dessus, la connaissance du mécanisme exact d'une transition phase n'est pas une condition essentielle pour mesurer des différences d'énergies libres en deux états différents de la matière.

La seconde étape, débutant vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, pourrait ainsi correspondre à un "glissement" sur les feuillets demeurant à la surface des feuillets qui formeront la seconde couche. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1, les feuillets- β peuvent s'empiler les uns sur les autres en intercalant leurs chaînes latérales dans les espaces formés entre les chaînes latérales dirigées vers le dessus et séparées par deux résidus sur la séquence. C'est ce que nous schématisons à la Fig. 31c.

Quant à la fraction de la PLL organisée en hélice- α , une transition monocouche-bicouche en deux étapes, telle que proposée pour la PLA, est tout à fait plausible. Ainsi, durant la seconde transition débutant vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ de nouvelles interactions feuillets-feuillets, feuillets-hélices (non

montrées) hélices-hélices seraient graduellement formées jusqu'à l'obtention d'une bicouche formée de l'empilement de feuillets- β et d'hélices- α .

Ainsi que nous l'avons considéré pour la PLA, la possibilité que la première transition observée sur l'isotherme Π -A de la PLL puisse correspondre à la transition monocouche-bicouche éventuelle de la fraction molaire organisée en hélice- α doit être envisagée. Pour une telle situation la réduction d'aire résiduelle pour la transition monocouche-bicouche de la fraction molaire organisée en hélice- α devrait être d'environ $0,81 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ ($0,1 \times 16,2 \text{ \AA}^2/\text{résidu}/2$). Par contre, cette réduction d'aire résiduelle est significativement plus faible que la réduction d'aire observée d'environ $2,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ entre le début ($16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) et la fin apparente ($14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) de la première transition. Il appert donc que les deux conformations observées dans les films de PLL soient miscibles et que les deux transitions impliqueraient de façon simultanée les deux principales conformations présentes.

4.4 Les isothermes de potentiel de surface (ΔV) - aire résiduelle (A) de la PLA et de la PLL

Dans cette section, nous montrons que l'analyse de la forme des isothermes ΔV -A obtenues pour la PLA et la PLL nous permet de renforcer l'existence et le positionnement des premières transitions de phase d'ordre second observées sur les isothermes Π -A de la PLA et de la PLL et, du

même coup, apporter des arguments supplémentaires en faveur d'une transition monocouche-bicouche graduelle et en deux étapes.

Cependant, il est important de rappeler qu'il est difficile de tirer des informations quantitatives des isothermes ΔV -A (chapitre 2). Par contre, en cernant les origines possibles du ΔV , ainsi que nous le verrons, il est possible de tirer des informations pertinentes à partir de l'allure des isothermes ΔV -A.

Comme la PLA et la PLL sont globalement neutres et que la sous-phase ne contient pas d'ions, les ΔV que nous mesurons, nous l'avons souligné ci-dessus, sont d'origine dipolaire. De plus, compte tenu du fait que les hélices- α sont organisées avec leur grand axe dans le plan de l'interface (Malcolm, B. R. (1973)), aucune contribution perpendiculaire du macro-dipôle des hélices n'est donc à prévoir. De la même façon, comme nous l'avons mentionné au chapitre 1, le squelette polypeptidique d'un feuillet- β antiparallèle ou parallèle ne possède pas de moment dipolaire résultant. Donc, une contribution directe au ΔV de la part de squelettes polypeptidiques organisés en feuillets- β n'est pas à prévoir non plus. Cependant, nous devons tenir compte qu'environ 10 % des résidus de la PLL pourraient être organisés en boucle- β . En se rapportant à la Fig. 4, nous pouvons remarquer que l'orientation de la liaison peptidique reliant les résidus $i+1$ et $i+2$ est perpendiculaire à celle des résidus dans les feuillets- β . Comme le moment dipolaire associé à la liaison peptidique est aligné selon les liaisons

CO et NH, une contribution nette au ΔV de la part de ces résidus est possible s'il existe un excès de ces dipôles orientés perpendiculairement à la normale de la surface aqueuse. D'autre part, une contribution importante des chaînes latérales aliphatiques n'est pas à prévoir étant donné qu'elles ne possèdent pas de dipôle permanent. De plus, pour un feuillet- β , il y a autant de chaînes latérales dirigées vers l'eau que vers l'air. La même situation prévaut pour un film d'hélices- α à l'interface air-eau. En conséquence, une contribution nette des chaînes latérales de la PLA et de la PLL est peu probable. Nous pouvons alors considérer, en première approximation, que l'origine des valeurs de ΔV que nous mesurons est indirecte et, comme on le rapporte dans la littérature (Malcolm, B. R. (1973)), elle devrait provenir principalement de la réorientation des molécules d'eau qui sont en contact avec les polypeptides. De plus, comme les transitions observées sur les isothermes Π -A sont d'ordre second et que cela implique, en théorie, que les différentes organisations des polypeptides sont miscibles (pas de séparation de phase), les variations de ΔV enregistrées par l'électrode radioactive (toujours placée près du flotteur de la balance, Fig. 7) devraient être représentatives des changements qui se déroulent sur l'entière surface de travail.

Nous présentons à la Fig. 32 les isothermes ΔV -A obtenues pour la PLA et la PLL.

Ainsi que nous pouvons le remarquer sur l'isotherme de la PLL, le ΔV croît de façon régulière à partir de l'aire résiduelle initiale (30 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$) jusqu'à l'obtention d'un pseudo-plateau vers 380 mV et une aire résiduelle d'environ 16,0 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$, tel qu'indiqué par la flèche.

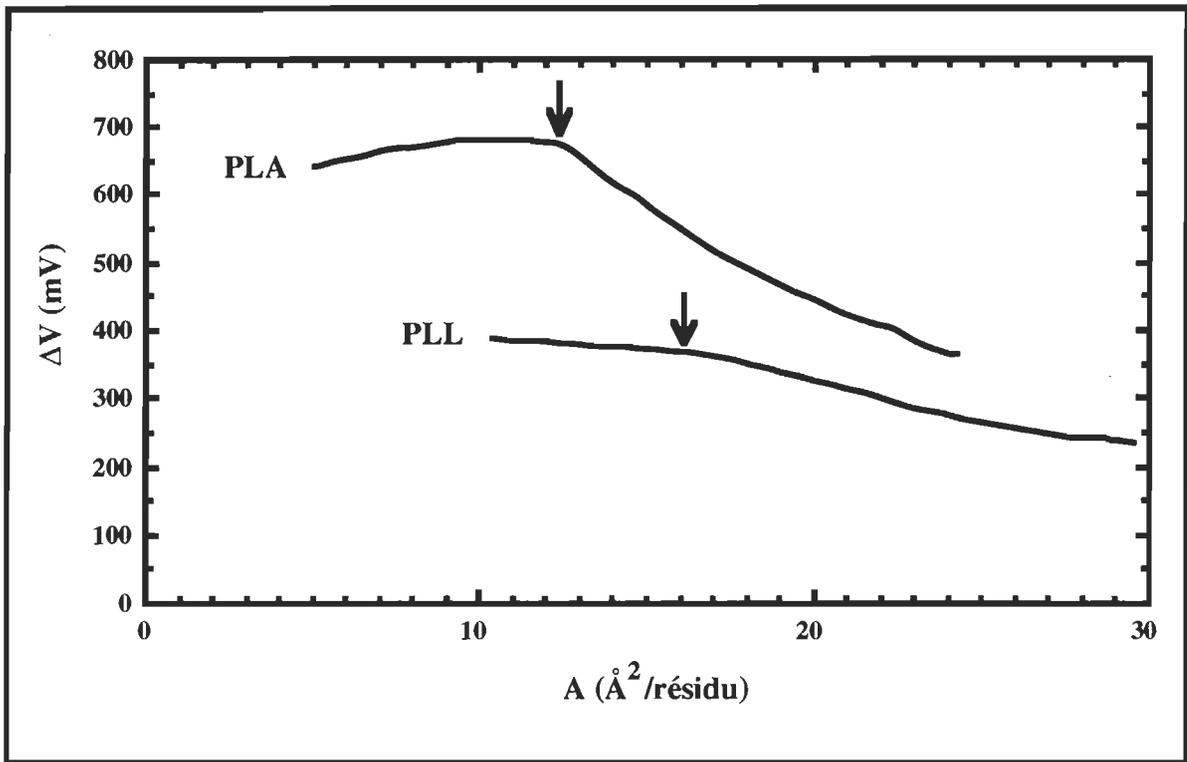


Figure 32. Isothermes ΔV -A obtenues pour la PLA et la PLL. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles indiquées à la légende de la Fig. 24.

De la même façon, nous pouvons aussi remarquer sur l'isotherme de la PLA, une croissance régulière du ΔV de l'aire résiduelle initiale (25 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$) jusqu'à l'obtention d'un pseudo-plateau vers 680 mV et une aire résiduelle de 12,5 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$ tel qu'indiqué par la flèche. Comme nous pouvons le constater, la valeur de ΔV au début du pseudo-plateau de la PLL

(environ 380 mV) est plus faible que celle observée pour la PLA (680mV). En première approximation cette différence pourrait provenir du fait que l'aire résiduelle (et la densité surfacique de molécules d'eau réorientées) de la PLL au début du pseudo-plateau est plus grande que celle de la PLA et que l'organisation des molécules d'eau réorientées puisse être différente dans les deux cas. Dans ce sens, Malcolm (Malcolm, B. R. (1973)) a montré, pour une série d'homopolypeptides organisés majoritairement en hélice- α avec des chaînes latérales aliphatiques de plus en plus longues, que la valeur de ΔV au début des plateaux diminue en fonction de la longueur de la chaîne latérale et de l'augmentation de l'aire résiduelle observée au début des pseudo-plateaux. Toutefois, une possible différence de l'organisation des molécules d'eau réorientées autour de la PLL et de la PLA est difficilement modélisable.

D'un autre côté, il est intéressant de noter, à ce stade-ci, que les pseudo-plateaux sur les isothermes ΔV -A de la PLL et de la PLA (Fig. 32) sont observés aux mêmes aires résiduelles où l'on observe le début des premières transitions sur les isothermes Π -A (Fig. 24). Nous reviendrons sur ce point important au paragraphe suivant. Mais avant de traiter de ce dernier point, nous voulons souligner la légère croissance du ΔV à partir de $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ sur l'isotherme de la PLL et la légère décroissance du ΔV sur l'isotherme de la PLA entre $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et $6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ *i.e.* la fin de la transition monocouche-bicouche (Fig. 24). Nous verrons plus loin que ces comportements de ΔV de la PLA et de la PLL pour des aires résiduelles

inférieures au début de la première transition peuvent s'expliquer à partir du mécanisme que nous proposons pour la transition monocouche-bicouche.

Comme nous venons de le souligner, les valeurs de ΔV enregistrées pour la PLA et la PLL augmentent graduellement à partir des aires résiduelles initiales jusqu'à l'obtention d'une discontinuité ou d'un pseudo-plateau aux aires résiduelles où sont observées les débuts des premières transitions de phase sur les isothermes Π -A de la PLA (12,5 Å²/résidu) et la PLL (16,0 Å²/résidu). Ce comportement résulte du fait que les valeurs de μ_{\perp} (voir chapitre 2) de la PLA et de la PLL sont constantes et que ces polypeptides ne forment pas d'agrégats aux valeurs d'aires résiduelles couvrant ces régions des isothermes ΔV -A. Des mesures préliminaires en microscopie à épifluorescence supportent cette dernière assertion.

Afin de montrer que μ_{\perp} est bien constant dans ces régions des isothermes ΔV -A, nous avons mis en graphique, en fonction de A, les valeurs de μ_{\perp} de la PLA et la PLL calculées à partir de la relation 2.9 (Fig. 33).

Comme nous pouvons le remarquer sur cette figure, les valeurs de μ_{\perp} sont effectivement constantes à l'intérieur de l'erreur expérimentale absolue sur ΔV (± 20 mV, voir chapitre 2 et correspondant à environ ± 10 mD pour la PLL à 16,0 Å²/résidu et environ ± 5 mD pour la PLA à 12,5 Å²/résidu)

entre les aires résiduelles initiales et les valeurs de A au début des pseudo-plateaux indiqués par les flèches.

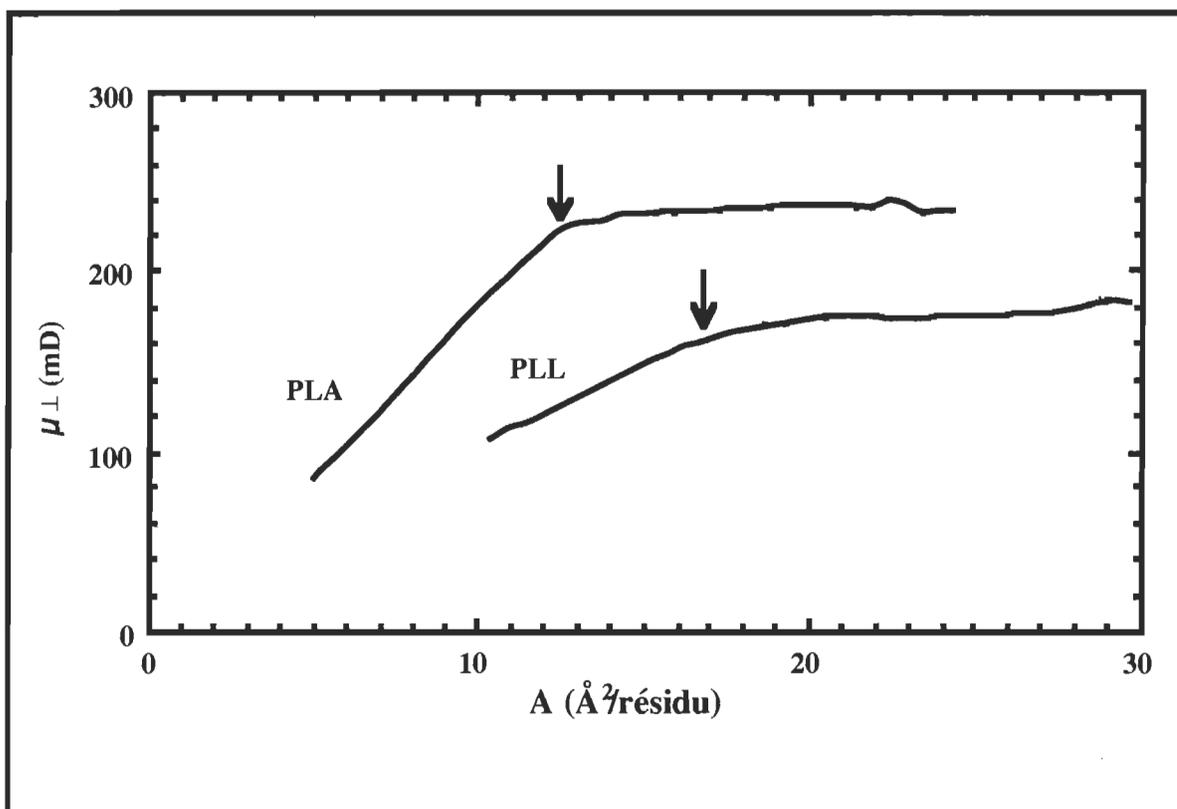


Figure 33. Graphiques du moment dipolaire perpendiculaire (μ_{\perp}) de la PLA et de la PLL en fonction de l'aire résiduelle (A).

En se référant à la relation 2.8, nous pouvons constater que des valeurs constantes de μ_{\perp} impliquent que la croissance de ΔV est en fait hyperbolique, *i.e.* que ΔV croît de façon proportionnelle à $1/A$. Nous montrons à la Fig. 34 qu'il est effectivement possible de simuler avec une excellente corrélation cette croissance hyperbolique de ΔV entre les valeurs d'aires résiduelles initiales et le début des pseudo-plateaux en utilisant des

valeurs constantes de μ_{\perp} de 230 mD pour la PLA et 170 mD pour la PLL pour calculer les valeurs de ΔV selon la relation 2.9.

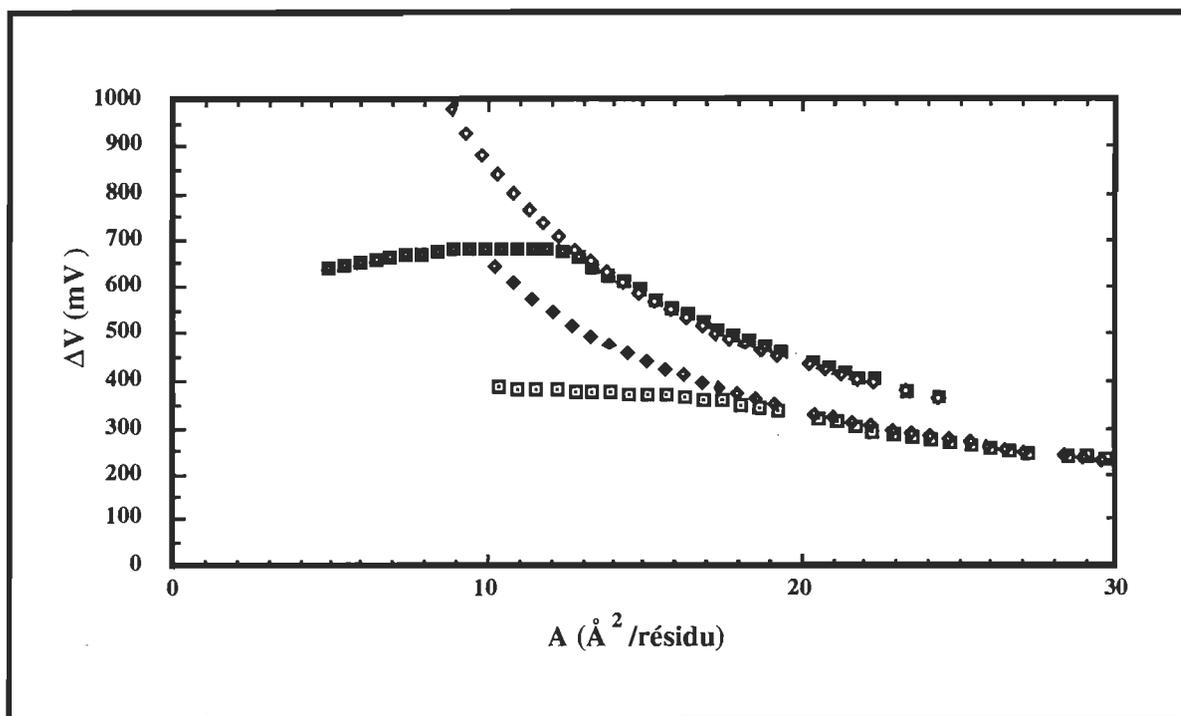


Figure 34. Simulation de la croissance hyperbolique de ΔV des isothermes ΔV - A de la PLA et de la PLL avant l'obtention des pseudo-plateaux sur les isothermes ΔV - A . Les carrés fermés représentent les points expérimentaux de l'isotherme ΔV - A de la PLA. Les losanges ouverts représentent les points simulés ou calculés pour la PLA à partir de la relation 2.9 et une valeur de μ_{\perp} égale à 230 mD. Les carrés ouverts représentent les points expérimentaux de l'isotherme ΔV - A de la PLL. Les losanges fermés représentent les points simulés ou calculés pour la PLL à partir de la relation 2.9 et une valeur de μ_{\perp} égale à 170 mD.

Une telle croissance hyperbolique de ΔV implique que la densité surfacique de la PLA et de la PLL (et des molécules d'eau réorientées) augmente de façon graduelle à partir des aires résiduelles initiales jusqu'au début des pseudo-plateaux de ΔV . Ainsi, l'obtention d'une discontinuité ou d'un

pseudo-plateau aux aires résiduelles correspondant au début de la première transition de phase observées sur l'isothermes Π -A, signifie que la densité surfacique des molécules de PLA et de PLL et des molécules d'eau réorientées y sont maximales. Nous avons vu à la section 4.3 que ces valeurs d'aire résiduelle constituent effectivement des valeurs limites compte tenu des dimensions des conformations présentes dans les films de PLA et de PLL. Ainsi, les aires résiduelles où débutent les pseudo-plateaux de ΔV devraient correspondre aux aires résiduelles à partir desquelles les films commenceraient à prendre une organisation tridimensionnelle. C'est effectivement pour cette raison que nous observons une diminution de μ_{\perp} pour des valeurs de A inférieures à $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ pour la PLA et $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ pour la PLL sur la Fig. 33. En effet, comme nous l'avons vu au chapitre 3, une telle décroissance de μ_{\perp} est observée parce que les valeurs de ΔV sont plutôt constantes et que les valeurs réelles de A des résidus qui contribuent au ΔV sont sous-estimées par densimétrie.

Nous revenons maintenant au comportement de ΔV durant les pseudo-plateaux de la PLA et de la PLL (Fig. 32).

La valeur de ΔV observée au début du pseudo-plateau de la PLA d'environ 680 mV correspond bien à la valeur du début du pseudo-plateau sur l'isotherme ΔV -A de la PLA publiée par Malcolm (Malcolm, B. R. (1973)). Il en va de même pour le reste de l'isotherme. Toutefois, Malcolm soutient que le début du pseudo-plateau de ΔV coïncide avec le début de la

transition observée à $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (Fig. 24, flèche a) et à laquelle il attribue le début de la transition monocouche-bicouche (Malcolm, B. R. (1973)). Cependant, en observant attentivement l'isotherme ΔV -A de la PLA qu'il présente dans sa publication, on peut remarquer que le pseudo-plateau de ΔV débute effectivement vers $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Comme nous l'avons souligné précédemment, l'isotherme ΔV -A de la PLA (Fig. 32) que nous avons enregistrée montre que le ΔV décroît d'environ 30 mV entre $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et $6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Nous montrons dans les prochaines lignes que ce comportement du ΔV durant le pseudo-plateau peut être consistant avec le mécanisme de la transition monocouche-bicouche graduelle en deux étapes que nous proposons à la Fig. 30.

Ainsi que nous le proposons, la première étape ou la première transition correspondrait à l'exclusion graduelle du film des hélices qui formeront la seconde couche et ce jusqu'à l'obtention d'un état intermédiaire entre la monocouche et la bicouche ou une hélice sur deux ne touche plus à la surface aqueuse tel que schématisé à la Fig. 30b. Pour un film de PLA organisé exclusivement en hélice- α , nous pouvons imaginer, pour un tel processus, que la quantité de résidus responsable de la réorientation des molécules d'eau (et responsable du ΔV) devrait demeurer plutôt constante jusqu'à la fin de cette transition avec comme résultat que le ΔV ne devrait pas varier de façon importante entre $12,5$ et $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Nous pouvons effectivement remarquer que le ΔV reste plutôt constant entre $12,5$ et $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Cependant, entre $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et $6,5$

$\text{\AA}^2/\text{résidu}$ ΔV diminue d'environ 50 mV et ce de façon plutôt graduelle. Ainsi que nous le proposons, durant la seconde transition (de 10,5 à 6,5 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$), on devrait assister à la formation graduelle de la bicouche comme telle. Comme la seconde couche ne devrait pas contribuer directement au ΔV et, ainsi que nous le proposons, pour les aires résiduelles inférieures à 10,5 $\text{\AA}^2/\text{résidu}$, une hélice sur deux ne toucherait plus à la surface aqueuse, il apparaît plausible que la densité surfacique de molécules d'eau réorientées à la surface et le ΔV devraient diminuer. Afin d'illustrer ce phénomène, nous montrons à la Fig. 35 une organisation des hélices avec un angle θ , tel que défini précédemment, de 45° .

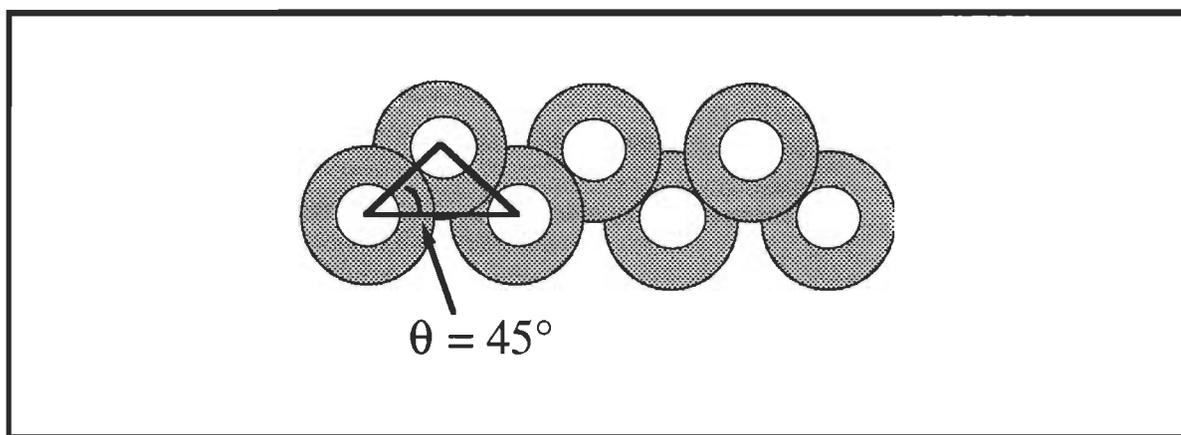


Figure 35. Représentation schématique d'un film de PLA organisé essentiellement en hélice- α avec une valeur d'angle θ de 45° .

On peut remarquer sur cette figure que la distance entre les hélices situées à la surface et contribuant indirectement au ΔV est augmentée par rapport à la distance pour des angles θ inférieurs à 30° . Ainsi, la densité surfacique de molécules d'eau réorientées de même que le ΔV devraient normalement

diminuer pour des valeurs de θ supérieures 30° . Comme nous pouvons le constater sur la Fig. 32, ΔV diminue effectivement à partir d'environ $10,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Cependant, pour des valeurs de θ supérieures à 45° , la distance entre les hélices de la couche en contact avec la surface aqueuse devrait graduellement diminuer jusqu'à l'obtention de la bicouche avec une augmentation concomitante de la densité de dipôles de molécules d'eau réorientés. Théoriquement, le ΔV devrait donc revenir à sa valeur initiale du début du pseudo-plateau. Cependant, comme nous l'avons discuté au chapitre 3, la seconde couche pourrait agir comme écran au potentiel électrostatique existant à l'interface polypeptide-eau. En conséquence, il est possible que le potentiel électrostatique généré à l'interface PLA-eau et ressenti par l'électrode radioactive soit plus faible que celui y existant réellement à cause du possible effet d'écran causé par la présence d'une couche supplémentaire de PLA entre l'interface PLA-eau et l'électrode radioactive. Ainsi, compte tenu du mécanisme que nous proposons pour la transition monocouche-bicouche de la PLA, la diminution du ΔV entre $10,5$ et $6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ pourrait s'expliquer par un éloignement graduel des hélices de la couche demeurant à la surface et un effet d'écran de la part des molécules qui forment la seconde couche. Comme la transition monocouche-bicouche de la fraction de PLA organisée en feuillet- β devrait aussi impliquer l'exclusion graduelle du film de molécules, un éloignement des brins demeurant à la surface aqueuse ainsi que le possible effet d'écran discuté ci-haut pourraient aussi être observés.

Comme nous l'avons souligné, les valeurs de ΔV augmentent légèrement et graduellement durant le pseudo-plateau de la PLL (Fig. 32). Cette légère croissance du ΔV pourrait s'expliquer par une contribution directe des molécules de PLL. Comme nous l'avons mentionné plutôt, une contribution dipolaire directe de la part des résidus dans les boucles- β est envisageable s'il existe un excès de dipôles associés à la liaison peptidique de ces résidus orientés perpendiculairement à la normale de la surface aqueuse. Une superposition graduelle de moments dipolaires au cours de la transition monocouche-bicouche devrait théoriquement mener à une augmentation graduelle du ΔV . Comme nous l'avons vu à la section 4.3, la modélisation de la transition monocouche-bicouche pour un film organisé en feuillet- β est plus difficile que pour un film organisé en hélice- α . Cependant, ainsi que nous le proposons (Fig. 31), le mécanisme de formation d'une bicouche de feuillets- β pourrait correspondre dans une première étape, au bris de liaisons-H afin de permettre l'éjection de la surface aqueuse d'une fraction des résidus et, dans une seconde étape, par un "glissement" sur les feuillets demeurant à la surface des feuillets qui formeront la seconde couche. Pour un tel mécanisme, étant donné que des résidus sont graduellement expulsés de la surface, on pourrait imaginer, au même titre que pour les hélices de PLA, un éloignement des brins demeurant à la surface et contribuant au ΔV par la réorientation des molécules d'eau avec une diminution concomitante de la densité surfacique de dipôles réorientés. La seconde couche de feuillets pourrait aussi agir comme écran au potentiel électrostatique généré par la réorientation des molécules d'eau à l'interface feuillet-eau. Comme nous

l'avons précédemment souligné, ces deux processus devraient mener à une diminution du ΔV . Par contre, nous observons une légère croissance du ΔV durant la transition monocouche-bicouche de la PLL. Il apparaît donc que la contribution directe des dipôles des résidus dans les boucles- β soit plus importante que la diminution du ΔV qui pourrait provenir d'un éloignement des brins (ainsi que des hélices- α en plus faible proportion) demeurant à la surface durant la transition et d'un effet possible d'écran. Comme le moment dipolaire d'une liaison peptidique est de l'ordre 3,5 D (Wada, A. (1976)), il apparaît plausible que la superposition graduelle d'un léger excès de ces dipôles orientés perpendiculairement à la surface aqueuse puisse expliquer la légère croissance de ΔV durant le pseudo-plateau.

4.5 Conclusion

Comme nous l'avons montré, les transitions monocouche-bicouche de la PLL, organisée majoritairement en feuillet- β antiparallèle, et de la PLA organisée majoritairement en hélices- α , devraient s'initier au début de la première transition de phase observée sur leurs isothermes Π -A. Ces transitions, inédites jusqu'à présent, précèdent les transitions de phase d'ordre second attribuées jusqu'à maintenant à la transition monocouche-bicouche pour les films de PLA majoritairement organisés en hélice- α (Malcolm, B. R. (1973) et Gabrielli *et al.* (1981)) et les films d'homopolypeptides hydrophobes organisés en feuillet- β (Baglioni *et al.* (1983)). Ainsi, il appert que les transitions monocouche-bicouche de ces deux homopolypeptides hydrophobes se déroulent en deux étapes. La

première étape pourrait correspondre à une exclusion graduelle de l'interface des molécules qui formeront la seconde couche jusqu'à l'obtention d'un état intermédiaire entre la monocouche et la bicouche. La seconde transition pourrait correspondre à la formation graduelle de la bicouche à partir de l'état intermédiaire. Même si nous n'avons pu mettre directement en évidence ces deux étapes hypothétiques pour la formation des bicouches de PLA et de PLL, nous verrons au chapitre suivant que, d'un point de vue énergétique, l'existence d'un tel mécanisme en deux étapes peut s'expliquer.

L'existence d'une transition monocouche-bicouche en deux étapes pourrait cependant être mise en évidence directement par l'enregistrement des isothermes ellipsométriques ($\delta\Delta$ -A) de la PLA et de la PLL. Le déphasage ellipsométrique ($\delta\Delta$) mesuré directement à l'interface air-eau est proportionnel à l'épaisseur des films qui y sont étalés. Comme l'existence d'un tel mécanisme devrait résulter en l'observation d'une augmentation progressive de l'épaisseur des films de PLA et de PLL et ce, en deux étapes, les isothermes ellipsométriques devraient idéalement décrire, à l'instar des isothermes Π -A, deux droites de pentes différentes avec une cassure entre les deux transitions. En plus de mettre en évidence le mécanisme de la transition monocouche-bicouche que nous proposons, les mesures ellipsométriques permettraient probablement de préciser la fin de la transition monocouche de la PLL. Malheureusement, en raison de problèmes techniques incontrôlables, nous n'avons pu enregistrer les isothermes ellipsométriques des homopolypeptides étudiés.

CHAPITRE 5

PROPOSITION D'UNE APPROCHE POUR MESURER LA CONTRIBUTION DES RESIDUS HYDROPHOBES A LA STABILISATION DE LA STRUCTURE TERTIAIRE DES PROTEINES GLOBULAIRES A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DES MONOCOUCHEs

Il existe un aspect du comportement des homopolypeptides hydrophobes à l'interface air-eau peu exploité dans la littérature. Il s'agit de la stabilisation apparente de l'organisation en bicouche de ces derniers. En effet, lorsque les homopolypeptides hydrophobes sont soumis à des cycles de compression et d'expansion durant la transition monocouche-bicouche, des boucles d'hystérèse sont généralement observées sur les isothermes Π -A (Albert et Cordoba (1984) et Kimura *et al.* (1988)). L'observation de boucles d'hystérèse pour un processus cyclique indique la formation d'un ou de plusieurs états métastables de la matière suite à une ou plusieurs transitions irréversibles durant ce processus (Everett et Whitton, (1952) et Cox et Katchalsky, (1972)). Nous verrons que pour fermer de tels cycles, une certaine quantité de travail doit être investie dans le système sous forme

d'énergie libre de stabilisation et que l'aire délimitée par une boucle d'hystérèse permet directement de quantifier cette quantité de travail ou d'énergie libre de stabilisation (Cox et Katchalsky (1972) et Lamarche, F. (1988)).

À notre connaissance, une telle exploitation des boucles d'hystérèse afin d'en extraire l'énergie libre de stabilisation des bicouches d'homopolypeptides hydrophobes à l'interface air-eau n'est pas mentionné dans la littérature. Ce fait est surprenant lorsque l'on considère la similitude entre la stabilisation de bicouches d'homopolypeptides hydrophobes et la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires qui repose essentiellement sur l'entassement de résidus hydrophobes à leurs interfaces (chapitre 1).

Dans ce contexte, nous avons enregistré les isothermes Π -A de compression-expansion de la PLA et de la PLL durant les transitions monocouche-bicouche. Comme nous le verrons, d'importantes boucles d'hystérèse sont observées. Nous exposons au cours de ce chapitre un traitement thermodynamique pour extraire l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) attribuable au transfert de résidus Alanine et Leucine de la surface aqueuse vers la bicouche à partir de ces boucles d'hystérèse. Les valeurs de ΔG_{stab} pour les résidus Alanine et Leucine que nous mesurons sont discutées en comparaison avec les valeurs de ΔG_{tr} de Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska et celles d'une autre échelle qui fut déterminée à partir de

coefficients de partition empiriques des résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur des protéines (Miller *et al.* (1987)). Nous verrons que les valeurs de ΔG_{stab} des résidus Alanine et Leucine que nous mesurons sont plus petites que les valeurs de ΔG_{tr} des chaînes latérales correspondantes rapportées par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska. Par contre, les valeurs de ΔG_{stab} que nous avons mesurées se comparent bien avec les valeurs correspondantes de ΔG_{tr} empiriques des résidus hydrophobes estimées à partir de la partition entre la surface et l'intérieur des protéines globulaires. Nous discutons de ces similitudes et différences en termes de perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales, de l'hydratation du squelette polypeptidique et de la diminution de la surface accessible des chaînes latérales dans les structures secondaires comparativement aux acides aminés libres (Nozaki et Tanford) ou à leurs analogues acétyle amides (Fauchère et Pliska) (chapitre 1). Les différents phénomènes que nous venons d'énumérer sont probablement occultés dans les mesures de ΔG_{tr} des chaînes latérales (chapitre 1). Par contre, nous montrons que ces différents phénomènes devraient être inclus de façon intrinsèque dans les valeurs de ΔG_{stab} que nous mesurons et les valeurs de ΔG_{tr} des différents résidus hydrophobes de Miller et collaborateurs (*op. cit.*).

5.1 Les isothermes Π -A de compression-expansion de la PLA et de la PLL

Nous présentons, aux Figures 36 et 37, des exemples d'isothermes Π -A de compression-expansion de la PLA et de la PLL enregistrées durant les transitions monocouche-bicouche.

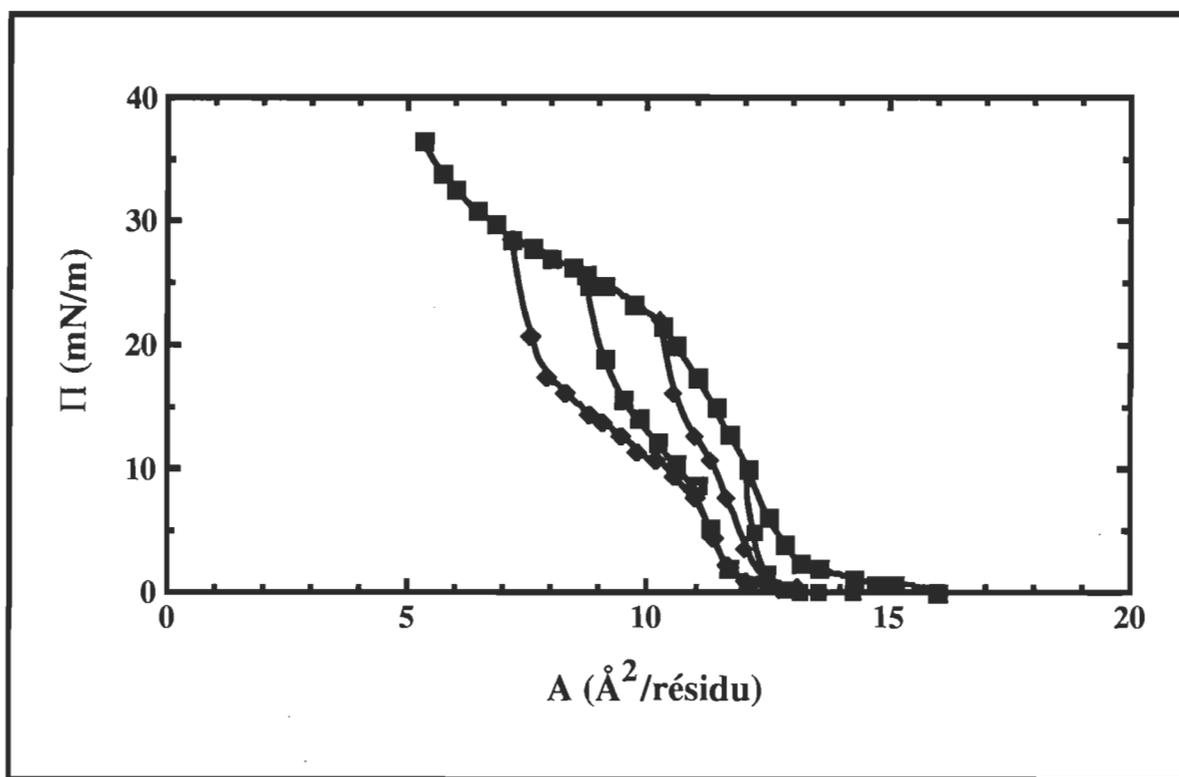


Figure 36. Exemples d'isothermes Π -A de compression-expansion obtenues pour la PLA lorsque les expansions furent opérées à partir de différentes valeurs d'aires résiduelles comprises entre le début et la fin de la transition monocouche-bicouche. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles énoncées à la Fig. 24.

Dans ce genre d'expérience, les films sont comprimés jusqu'à la valeur d'aire résiduelle souhaitée et décomprimés par la suite jusqu'à pression de

surface nulle. Les différentes compressions et expansions sont effectuées dans des conditions d'équilibre thermodynamique (voir chapitre 2).

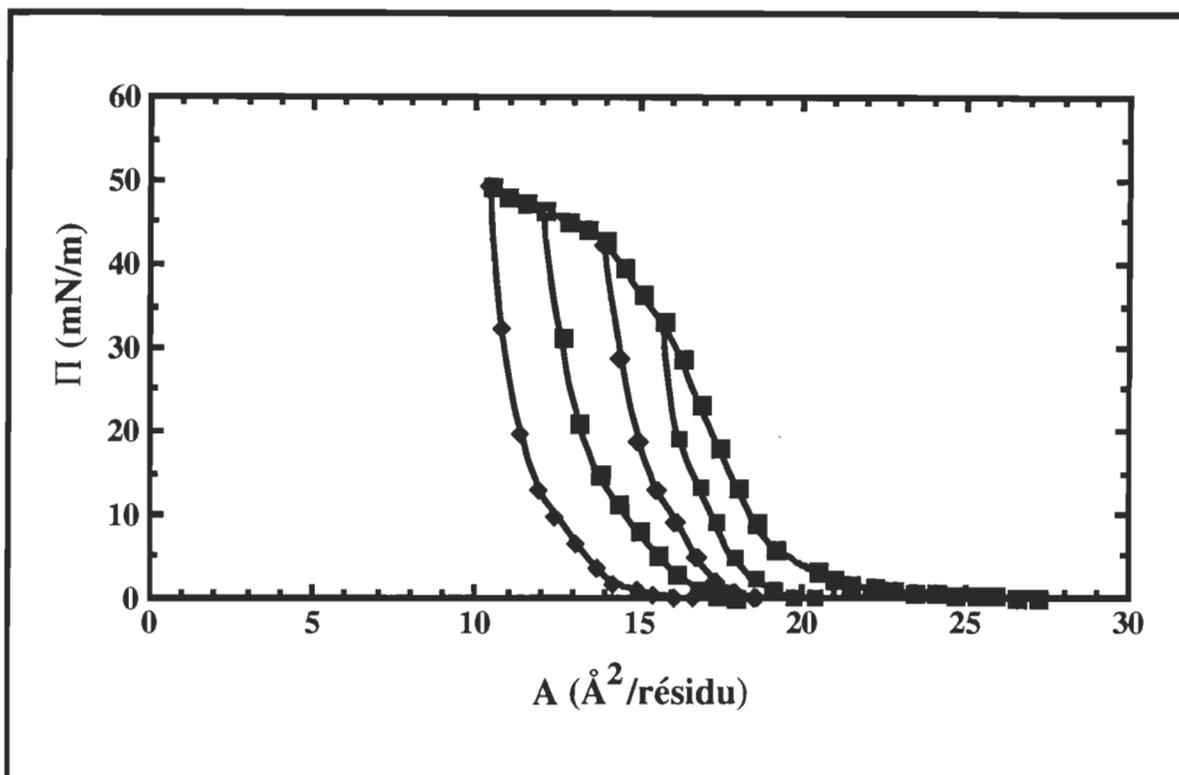


Figure 37. Exemples d'isothermes Π - A de compression-expansion obtenues pour la PLL lorsque les expansions furent opérées à partir de différentes valeurs d'aires résiduelles plus petites que le début de la transition monocouche-bicouche. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles énoncées à la Fig. 24.

Sur ces figures nous constatons d'importantes boucles d'hystérèse qui montrent une stabilisation apparente des films de PLA et de PLL durant les transitions monocouche-bicouche. Des boucles d'hystérèse sont aussi observées lorsque des expansions sont opérées avant le début de la transition monocouche-bicouche, montrant ainsi que l'état monomoléculaire des films

de PLA et de PLL est aussi stabilisé (résultat non-montré). Nous reviendrons sur ce point à la section suivante.

5.2 Thermodynamique de la stabilisation des bicouches de PLA et PLL

Nous présentons dans cette section les bases thermodynamiques qui nous permettront d'extraire des boucles d'hystérèse les énergies libres de stabilisation des bicouches de PLA et de PLL et de calculer la contribution par résidu transféré à cette stabilisation.

Le travail ou la variation de l'énergie libre associée à la compression (ΔG_{comp}) d'un film étalé à l'interface air-eau est donnée par la relation 5.1a. En inversant les bornes de l'intégrale, on obtient le travail ou la variation d'énergie libre d'expansion des films (ΔG_{exp}) (relation 5.1b).

$$\Delta G_{\text{comp}} = \int_0^{\Pi_f} A d\Pi \quad (5.1a)$$

$$\Delta G_{\text{exp}} = \int_{\Pi_f}^0 A d\Pi \quad (5.1b)$$

Pour un film étalé à l'interface air-eau se comportant de façon réversible, le travail de compression est égale au travail d'expansion.

$$\Delta G_{\text{comp}} = -\Delta G_{\text{exp}} \quad (5.2)$$

Par convention, le signe du travail que l'on effectue sur un système est positif et le travail effectué par le système est de signe négatif. Les unités de ces intégrales peuvent être données en calories (cal) par mole de résidus. L'utilisation des calories comme unité d'énergie est usuelle dans le domaine de la stabilité des protéines, nous utiliserons ainsi ces unités pour le reste du travail malgré le fait que le Joule (J) soit l'unité officielle (1 cal = 4.184 joules). Une variation de pression de surface de 1 mN/m correspond à une variation de l'énergie libre à la surface de 1 mJ/m² ou 0,239 × 10⁻²⁰ mcal/Å². Comme l'intégration correspond physiquement à la somme de produits du type $A \cdot d\Pi$ (Å²/résidu · 10⁻²⁰ mcal/Å²), les unités des intégrales sont donc du type 10⁻²⁰ mcal/résidu. En multipliant par le nombre d'Avogadro (6,022 × 10²³ mol⁻¹) nous obtenons effectivement des intégrales en cal/mol de résidus.

Si le film ne se comporte pas de façon réversible, cette égalité ne tient plus. En effet, si en effectuant un travail sur un film étalé à l'interface air-eau ce dernier répond en se transformant de façon irréversible, une partie de son énergie libre est dissipée et, en conséquence, le travail qu'il peut fournir s'en trouve amputé. Comme les transitions irréversibles (spontanées) à l'intérieur d'un système thermodynamique s'effectuent vers des états de plus grande stabilité, l'énergie libre dissipée est normalement emmagasinée sous forme d'énergie libre de stabilisation (Cox et Katchalski (1972) et Revzin *et. al.* (1973)). L'énergie libre emmagasinée sous forme

d'énergie libre de stabilisation lors d'un travail de compression opéré sur un film à l'interface air-eau ne peut être utilisée ensuite par le système pour effectuer un travail d'expansion. Pour un film d'homopolypeptides hydrophobes à l'interface air-eau se transformant de façon irréversible en cours de compression, le travail d'expansion qu'il peut fournir est nécessairement plus petit que le travail de compression que nous lui avons préalablement fourni. Il peut être démontré que l'énergie libre emmagasinée sous forme d'énergie libre de stabilisation au cours d'un processus cyclique est donnée par l'intégration du travail durant ce cycle ou par l'aire délimitée par la boucle d'hystérèse observée (Cox et Katchalzyk (1972) et Revzin *et al.* (1973) et Lamarche, F. (1988)), cette relation est:

$$\Delta G_{\text{stab}} = \int_0^{\Pi_f} \text{Ad}\Pi + \int_{\Pi_f}^0 \text{Ad}\Pi \quad (5.3)$$

De la même façon, l'énergie libre de stabilisation apparente (ΔG_{stab}) des films de PLA et PLL est donnée directement par le bilan des travaux de compression et d'expansion (relation 5.3).

Afin de rendre plus concrètes les considérations thermodynamiques que nous venons de discuter, nous en présentons une représentation schématique à la Fig. 38 en prenant comme exemple différentes isothermes Π -A de compression et d'expansion obtenues pour la PLA.

Nous présentons à la Fig. 38a le travail de compression (ΔG_{comp}) nécessaire pour amener le film de PLA d'une pression de surface nulle jusqu'à une pression de surface d'environ 30 mN/m en passant par la transition monocouche-bicouche. Ce travail est donnée par la surface hachurée. À la Fig. 38b, nous représentons le travail d'expansion fourni par le film de PLA pour passer d'une pression de surface d'environ 30 mN/m jusqu'à une pression de surface nulle. De la même façon, ce travail d'expansion est donnée par la surface hachurée.

Comme nous pouvons le constater, le travail de compression est plus grand, en valeur absolue, que le travail d'expansion. Ainsi, une fraction de l'énergie libre fournie au film de PLA a été emmagasinée en cours de compression sous forme d'énergie libre de stabilisation. Comme nous le montrons à la Fig. 38c, cette quantité d'énergie libre de stabilisation est donnée par la surface hachurée comprise dans la boucle d'hystérèse qui représente en fait la différence entre le travail de compression et le travail d'expansion (relation 5.3). Ce résultat implique que la transition monocouche-bicouche est de nature irréversible (spontanée). Nous pouvons attribuer à l'interaction hydrophobe l'irréversibilité de la transition et la stabilisation de l'organisation en bicouche des molécules de PLA. En effet, le transfert de composés hydrophobes d'un milieu aqueux vers un milieu hydrophobe (effet hydrophobe) est spontané ($\Delta G_{\text{tr}} < 0$, voir chapitre 1).

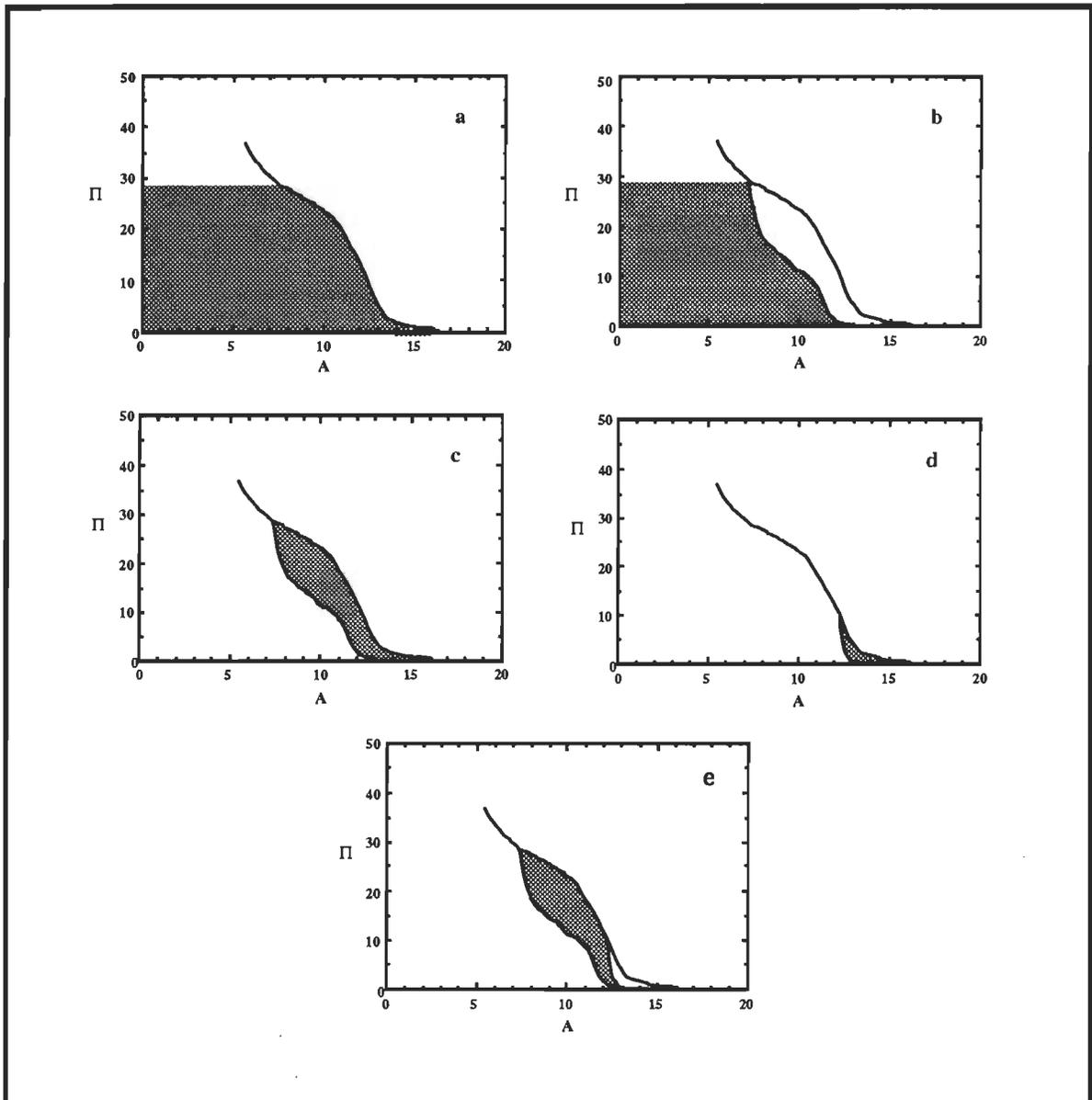


Figure 38. a- Représentation graphique du travail de compression pour amener un film de PLA d'une pression de surface initiale nulle jusqu'à une pression de surface finale d'environ 30 mN/m. b- Représentation graphique du travail d'expansion fourni par un film de PLA en passant d'une pression de surface initiale d'environ 30 mN/m jusqu'à une pression de surface finale nulle. c- Représentation graphique de l'énergie libre emmagasinée sous forme d'énergie libre de stabilisation durant le cycle compression-expansion présenté en a et b. d- Boucle d'hystérèse obtenue lorsque l'expansion fut opérée au début de la transition. e- Représentation graphique de l'énergie libre de stabilisation apparente de la bicouche de PLA attribuable au transfert de résidus de l'interface vers la bicouche.

Donc, l'énergie libre des résidus transférés vers la bicouche où ils peuvent former des interactions de type van der Waals favorables est réduite par rapport à l'énergie libre qu'ils possèdent lorsqu'ils sont dans l'eau.

Cependant, nous voulons mesurer l'énergie libre de stabilisation de la bicouche de PLA associée au transfert de résidus de la surface aqueuse vers la bicouche. Pour ce faire, nous devons soustraire de la surface intégrée de l'hystérèse présentée à la Fig. 38c, la surface intégrée de l'hystérèse obtenue pour le cycle de compression-expansion opéré entre la pression de surface nulle et la pression de surface du début de la transition monocouche-bicouche (Fig. 38d). Comme nous pouvons le constater, l'entassement des molécules de PLA au début de la transition monocouche-bicouche est aussi stabilisé. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, les hélices- α de PLA sont interdigitées au début de la transition monocouche-bicouche. L'interdigitation d'hélices- α minimise les contacts entre l'eau et les chaînes latérales hydrophobes et il devrait ainsi en résulter une stabilisation des hélices par l'interaction hydrophobe. De la même façon, il fut montré par Cohen et collaborateurs (Cohen *et al.* (1981)) que lors de la formation des feuillets- β , à partir de brins- β isolés, qu'en moyenne 20 % de la surface des résidus est rendu inaccessible au solvant. Ainsi, l'entassement des feuillets- β en cours de compression devrait conduire à une stabilisation dans le plan de l'interface causée par l'interaction hydrophobe (et les liaisons-H) entre résidus adjacents. Donc, l'énergie libre de stabilisation due au transfert de

résidus de la surface aqueuse vers la fraction de la bicouche de PLA formée à une valeur de Π d'environ 30 mN/m est donnée par la différence entre la surface intégrée de l'hystérèse obtenue pour l'expansion effectuée à partir 30 mN/m et la surface intégrée résultant de l'hystérèse obtenue pour le cycle de compression-expansion opéré avant le début de la transition monocouche-bicouche (Fig.38e).

Le raisonnement que nous avons fait pour la PLA est applicable pour la PLL qui montre elle aussi une boucle d'hystérèse lorsqu'une expansion est effectuée au début de la transition monocouche-bicouche (16,0 Å²/résidu).

Afin de déterminer l'énergie libre de stabilisation des bicouches complètes de PLA et de PLL, nous avons porté en graphique l'énergie libre de stabilisation emmagasinée dans les fractions de bicouches formées et calculées à partir de l'intégration des différentes boucles d'hystérèse (Figures 36 et 37) en fonction du degré d'avancement (B_f) de la formation des bicouches (Figures 39 et 40). Le degré d'avancement de la formation des bicouches de PLA et de PLL est donné par la relation 5.4.

$$B_f = (A_e - A_m) / (A_b - A_m) \quad (5.4)$$

où A_e = l'aire résiduelle à partir de laquelle l'expansion est initiée

A_m = l'aire résiduelle au début de la transition monocouche-
bicouche

A_b = l'aire résiduelle à la fin de la transition monocouche-
bicouche.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent A_m et A_b pour la PLA valent respectivement 12,5 et 6,5 Å²/résidu. Pour la PLL nous avons montré que A_m vaut 16,0 Å²/résidu. D'un autre côté, comme il nous a été impossible de mesurer la fin de la transition monocouche-bicouche, nous avons utilisé une valeur de A_b de 8,0 Å²/résidu, soit la moitié de la valeur de A_m .

De façon cohérente au raisonnement fait ci-haut, nous pouvons remarquer aux Figures 39 et 40 que l'énergie libre de stabilisation à $B_f = 0$ sont nulles. En effet, comme nous sommes intéressés à la stabilisation des films résultant du transfert de résidus hydrophobes de la surface aqueuse vers la bicouche, nous devons soustraire, de toutes les boucles d'hystérèse obtenues pour des expansions initiées à des valeurs d'aires résiduelles plus grandes ou égales à A_m ($B_f \geq 0$), l'énergie libre de stabilisation des films monomoléculaires donnée par l'intégration des boucles d'hystérèse obtenues

à partir des expansions initiées au début des transitions monocouche-bicouche lorsque $A_e = A_m$ ou à $B_f = 0$.

Nous montrons, à la Fig. 39 et à la Fig. 40, que c'est par deux droites de pentes différentes que la relation entre les ΔG_{stab} apparents et B_f peut être la mieux décrite. L'utilisation d'une seule droite pour décrire la variation de l'énergie libre de stabilisation apparente entre $B_f = 0$ et $B_f = 1$ génère des valeurs d'ordonnées à l'origine plus petites que zéro et plus élevées en valeur absolue que l'erreur relative sur les valeurs de ΔG_{stab} .

Comme nous venons de le voir, ce résultat n'est pas réaliste. Les états monomoléculaires de la PLA et de la PLL au début de la transition monocouche-bicouche sont stabilisés. De plus, de la même façon que l'énergie libre est souvent reliée à la fraction molaire (X) par une relation logarithmique du type $\Delta G = -RT \ln X$, nous avons vérifié si la relation entre les ΔG_{stab} apparents et B_f était de ce type. Le coefficient de corrélation de la droite de ΔG_{stab} en fonction de $\ln B_f$ était plus faible que pour le cas où la relation empirique entre ΔG_{stab} et B_f est attribuée à une seule relation linéaire. Ainsi, les taux de variation de l'énergie libre de stabilisation apparente en fonction du degré d'avancement de la formation des bicouches de PLA et de PLL semblent donc effectivement biphasiques et linéaires.

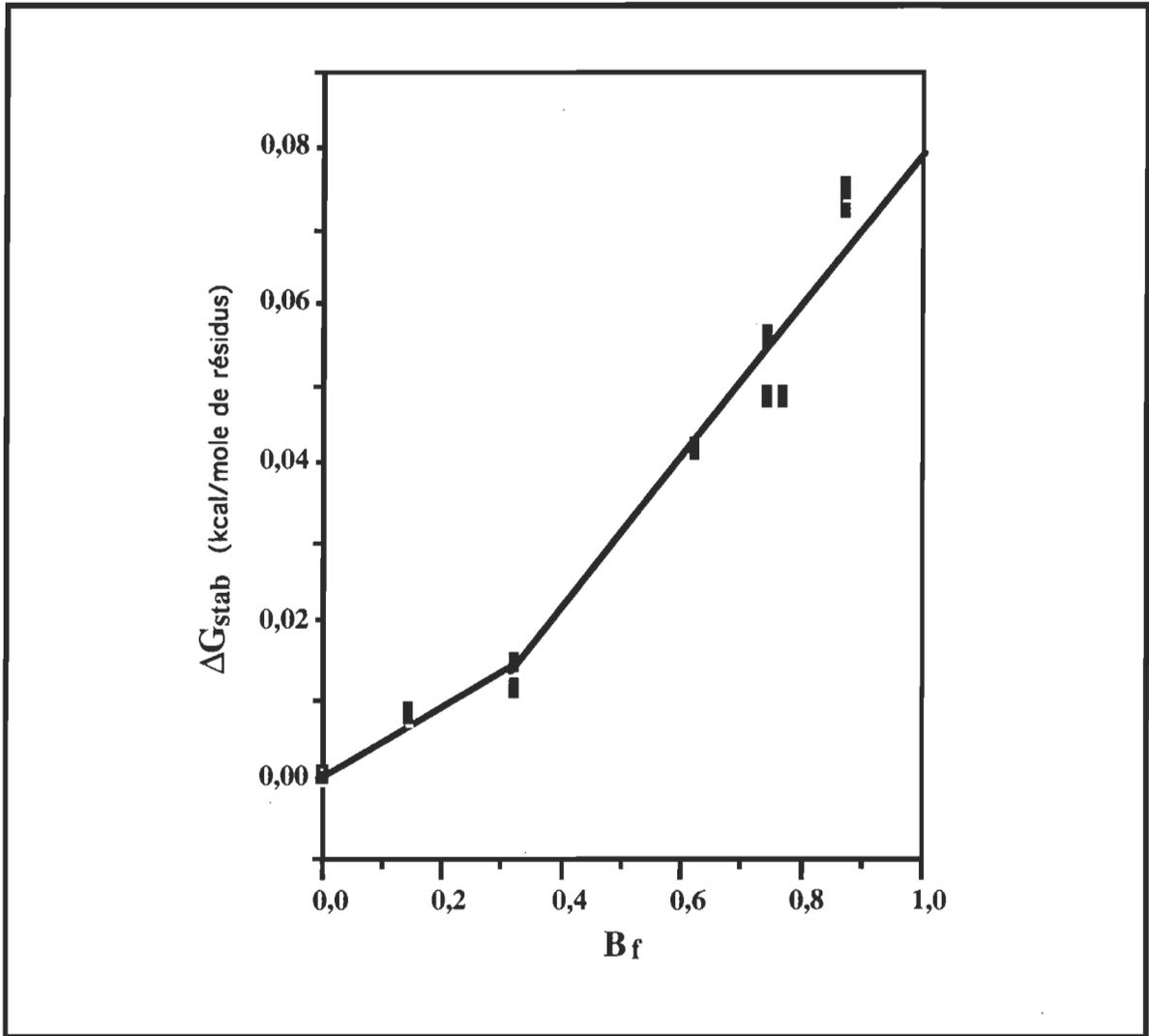


Figure 39. Graphique de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) emmagasinée dans les films de PLA en fonction du degré d'avancement de la formation de la bicouche (B_f). Compte tenu du fait que l'intégration de la surface des boucles d'hystérèse représente physiquement la somme des produits d'éléments du type $A \cdot d\Pi$, l'erreur relative sur les ΔG_{stab} peut être approximée par la somme des erreurs relatives sur Π et sur A soit environ 10 % au maximum.

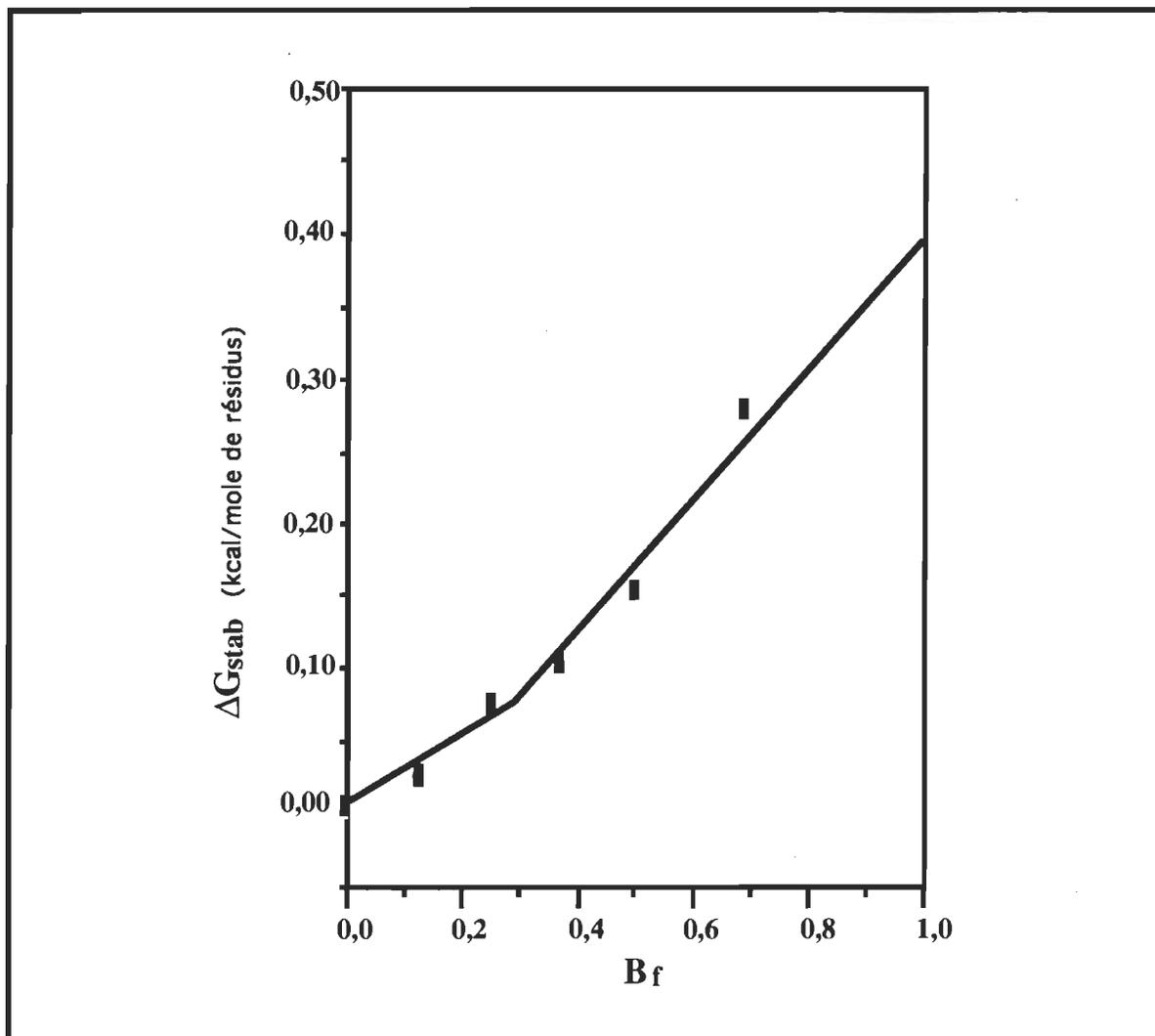


Figure 40. Graphique de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) emmagasinée dans les films de PLL en fonction du degré d'avancement de la formation de la bicouche (B_f). Compte tenu du fait que l'intégration de la surface des boucles d'hystérèse représente physiquement la somme des produits d'éléments du type $A \cdot d\Pi$, l'erreur relative sur les ΔG_{stab} peut être approximée par la somme des erreurs relatives sur Π et sur A soit environ 10 % au maximum.

Il est intéressant de noter que les points de cassure sur les Figures 39 et 40 surviennent à des valeurs de B_f correspondant aux aires résiduelles où

sont observées la fin des premières transitions de phase sur les isothermes Π -A de la PLA (Fig. 24, $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et $B_f = 0,33$) et de la PLL (Fig. 24, $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et $B_f = 0,25$). Les deux droites pourraient ainsi décrire la stabilisation des films de PLA et de PLL au cours des deux transitions observées sur leurs isothermes Π -A et aux processus moléculaires qu'elles décrivent.

Comme nous l'avons proposé au chapitre précédent, les premières transitions pourraient correspondre à l'exclusion progressive de la surface aqueuse des molécules de PLA et de PLL qui formeront la seconde couche jusqu'à l'obtention d'un état intermédiaire entre la monocouche et la bicouche. Pour un tel processus, une stabilisation de l'état intermédiaire par l'interaction hydrophobe est tout à fait vraisemblable. L'observation d'une variation de l'énergie libre de stabilisation linéaire entre $B_f = 0$ ($12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) et $B_f = 0,33$ ($10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) pour la PLA et $B_f = 0$ ($16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) et $B_f = 0,25$ ($14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) pour la PLL serait aussi compatible avec le fait qu'une transition de phase d'ordre second doit effectivement se dérouler de façon graduelle. Ainsi que nous l'avons aussi proposé, la seconde transition de phase d'ordre second observée sur les isothermes Π -A de la PLA et la PLL correspondrait à la formation graduelle de la bicouche. Alors, à mesure que cette transition se déroule, les interactions de van der Waals entre les chaînes latérales hydrophobes au sein de la bicouche seraient graduellement formées, ce qui pourrait expliquer l'augmentation linéaire du ΔG_{stab} à partir du début de la seconde transition,

i.e. à partir de $B_f = 0,33$ ou $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ pour la PLA et $B_f = 0,25$ ou $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ pour la PLL.

Donc, la stabilisation des bicouches de PLA et de PLL résulterait, dans une première étape, en l'exclusion graduelle des résidus des molécules qui formeraient la deuxième couche initialement en contact avec la surface aqueuse et, dans une seconde étape, en l'optimisation des contacts de type van der Waals entre ces résidus et les résidus de la première couche. Cette stabilisation biphasique semble bien correspondre à la définition de l'interaction hydrophobe, laquelle, nous l'avons souligné au chapitre 1, est composée à la fois de l'effet hydrophobe (augmentation de l'entropie des molécules d'eau initialement en contact avec les résidus hydrophobes) et des interactions de type van der Waals entre les atomes des chaînes latérales hydrophobes.

5.3 Extraction de l'énergie libre de stabilisation (ΔG_{stab}) attribuable au transfert de résidus Alanine et Leucine de la surface aqueuse vers les bicouches

Comme nous pouvons le constater sur la Fig. 39, le ΔG_{stab} de la bicouche complète de PLA ($B_f = 1$) que nous extrapolons vaut environ $0,08 \text{ kcal/mol}$ de résidus. Cependant, notre but est de déterminer la contribution à la stabilisation de la bicouche par les résidus qui sont transférés de la surface aqueuse vers la bicouche. D'un autre côté, il est important de noter que ce ne sont pas tous les résidus qui passent d'un milieu aqueux vers un

milieu hydrophobe durant la transition monocouche-bicouche. En effet, Malcolm a proposé sur la base de l'organisation des hélices- α de PLA à l'état solide (Malcolm, B. R. (1973)), que pour un film d'hélices- α interdigitées de PLA à l'interface air-eau, environ 22,5 % des résidus sont effectivement dans l'eau. Le reste des résidus (77,5 %) sont respectivement impliqués dans les interactions hélices-hélices (environ 55,5 %) ou dirigés vers la phase gazeuse (environ 22,5 %). De la même façon, pour une organisation des homopolypeptides en feuillet- β , un résidu sur deux se retrouve en contact avec la sous-phase aqueuse. Ainsi, afin d'obtenir la contribution des résidus qui sont effectivement transférés de la surface aqueuse vers la bicouche, la valeur de ΔG_{stab} de la bicouche complète de 0,08 kcal/mol de résidus doit être pondérée par la fraction de résidus initialement en contact avec la surface aqueuse. Le facteur de pondération pour un film d'hélices- α de PLA serait donc 4,44 (1/0,225) et 2,0 (1/0,5) pour un film de feuillet- β . Alors, pour une organisation à 100 % en hélices- α de la PLA, le ΔG_{stab} effectif (attribuable à la fraction des résidus initialement en contact avec la phase aqueuse et qui sont transférés) serait de 0,36 kcal/mol (4,44 x 0,08 kcal/mol de résidus). Cependant, nous avons montré que les films de PLA que nous avons étudiés contenaient approximativement 90 % d'hélices- α et 10 % de feuillet- β . Par conséquent le ΔG_{stab} apparent de la bicouche complète (apparent au sens qu'il implique tous les résidus) doit être pondéré pour le nombre de résidus transférés en fonction des deux conformations présentes dans les films de PLA et de la fraction molaire de chacune d'elles. Ainsi, nous estimons le ΔG_{stab} effectif

pour un résidu Alanine organisé en hélices- α à 90 % et en feuillets- β à 10 % à 0,34 kcal/mol de résidus ($0,9 \times 4,44 \times (0,08 \text{ kcal/mol de résidus}) + 0,1 \times 2 \times (0,08 \text{ kcal/mol de résidus})$).

Comme nous pouvons le constater, le ΔG_{stab} résultant du transfert effectif d'un résidu Alanine de l'interface vers la bicouche est du même ordre de grandeur que les valeurs de ΔG_{tr} pour la chaîne latérale de l'Alanine estimées par le transfert de l'eau vers un solvant organique par Nozaki et Tanford (0,5 kcal/mol) et Fauchère et Pliska (0,42 kcal/mol). Cependant, la valeur que nous mesurons est un peu plus faible. Nous allons revenir, à la section 5.4, sur les raisons pouvant expliquer un écart entre la valeur que nous mesurons pour un résidu Alanine selon notre approche et celles mesurées par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska pour sa chaîne latérale seulement.

Le ΔG_{stab} apparent pour la bicouche complète de PLL que nous extrapolons à $B_f=1$ est d'environ 0,39 kcal/mol de résidus. De la même façon que pour la PLA, cette valeur doit être pondérée pour la fraction de résidus initialement présents à la surface de l'eau avant le début de la transition monocouche-bicouche en tenant compte des différentes conformations présentes dans le film. Comme nous l'avons montré au chapitre précédent, environ 80 % des squelettes polypeptidiques sont organisés en feuillets- β antiparallèles, environ 10 % en boucles- β de type non-défini et environ 10 % en hélices- α . Un problème se pose avec le 10 %

de boucles- β de type non-défini en relation avec le nombre de résidus par boucle effectivement transférés de l'eau vers la bicouche. En effet, comme nous pouvons le constater à la Fig. 4, dépendamment du type de boucle, au maximum quatre et au minimum aucune des chaînes latérales des boucles peuvent être dirigées vers la sous-phase. Ainsi, nous intégrerons le pourcentage de boucles- β au pourcentage de feuillet- β et considérerons, au même titre que pour un feuillet- β , qu'une chaîne latérale sur deux est transférée de l'eau vers la bicouche. Evidemment, cette approximation ajoute à l'incertitude de la valeur de ΔG_{stab} effectif que nous estimons pour un résidu Leucine. Pour la fraction de PLL organisée en hélice- α , nous approximations la fraction de résidus effectivement transférée à 0,225 comme pour la PLA. Ainsi, le ΔG_{stab} attribuable au transfert de la fraction de résidus effectivement transférés de l'eau vers la bicouche peut être approximé à 0,87 kcal/mol ($0,9 \times 2 \times (0,39 \text{ kcal/mol de résidus}) + 0,1 \times 4,44 \times (0,39 \text{ kcal/mol de résidus})$). En comparaison avec les valeurs de Nozaki et Tanford (1,8 kcal/mol) et de Fauchère et Pliska (2,32 kcal/mol), nous pouvons constater que le ΔG_{stab} effectif que nous estimons pour le transfert de résidus Leucine de l'interface vers la bicouche est plus faible d'environ deux à trois fois. Nous discutons à la section suivante des possibles raisons sous-jacentes à cette différence.

5.4 Comparaisons entre les valeurs de ΔG_{stab} effectifs mesurés pour les résidus Alanine et Leucine et celles de ΔG_{tr} des chaînes latérales de Nozaki-Tanford et Fauchère-Pliska ainsi que les valeurs de ΔG_{tr} empiriques de Miller et collaborateurs

Comme nous venons de le montrer et comme nous pouvons le constater au Tableau 7, les ΔG_{stab} effectifs pour les résidus Alanine et Leucine que nous avons mesurés sont plus faibles que les valeurs de ΔG_{tr} des chaînes latérales correspondantes mesurées par Nozaki et Tanford (Nozaki et Tanford (1971)) et Fauchère et Pliska (Fauchère et Pliska (1983)).

Tableau 7
Comparaison entre les valeurs de ΔG_{stab} effectifs (en kcal/mol) estimées dans ce travail et les valeurs correspondantes de ΔG_{tr} évaluées par d'autres auteurs

	Notre étude	Nozaki et Tanford ¹	Fauchère et Pliska ²	Miller <i>et al.</i> ³
Alanine	0,34	0,5	0,42	0,20
Leucine	0,87	1,8	2,32	0,65

¹ Nozaki et Tanford (1971).

² Fauchère et Pliska (1983).

³ Miller *et al.* (1987).

Comme nous l'avons discuté au chapitre 1, ces ΔG_{tr} ne peuvent tenir compte de certaines forces importantes qui pourraient faire en sorte que la contribution effective des résidus hydrophobes à la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires, telle qu'approximée par ces

ΔG_{tr} , soit surestimée. Parmi ces forces importantes et occultées dans l'approche utilisée par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska pour mesurer les ΔG_{tr} des chaînes latérales, il y a l'énergie libre d'hydratation des atomes polaires des résidus et la perte d'entropie conformationnelle qu'elles subissent lors de leur enfouissement à l'intérieur des protéines. Nous discutons, à la section suivante, du fait que ces forces devraient être incluses dans les valeurs de ΔG_{stab} effectifs que nous mesurons.

Le but de cette discussion n'est cependant pas de prédire exactement l'ampleur de ces différentes forces, mais plutôt de montrer que la contribution réelle des résidus Leucine et Alanine à la stabilisation de la structure tertiaire des protéines globulaires devrait nécessairement être plus petite que les valeurs de ΔG_{tr} de Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska. En ce sens, nous montrons dans cette section que nos valeurs de ΔG_{stab} effectifs se comparent bien avec les valeurs de ΔG_{tr} pour les résidus Leucine et Alanine obtenues à partir d'une autre approche qui nous apparaît empreinte d'un plus grand réalisme que l'approche utilisée par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska.

Ainsi que nous l'avons vu au chapitre 1, l'hydratation des atomes polaires des résidus devrait faire en sorte de diminuer la force apparente de l'interaction hydrophobe telle qu'estimée par les ΔG_{tr} des chaînes latérales seules. L'énergie libre défavorable causée par la présence des chaînes latérales hydrophobes dans l'eau devrait être globalement diminuée par

l'énergie libre d'hydratation favorable des atomes polaires (CO-NH) du squelette polypeptidique. L'énergie libre d'hydratation des atomes polaires du squelette polypeptidique, telle qu'approximée par l'énergie libre d'hydratation d'un résidu Glycine dans un brin- β isolé, pourrait atteindre -0,82 kcal/mol (Oobatake et Ooi (1993)).

Cependant, la surface accessible de ces atomes pour un résidu dans une hélice- α et dans un feuillet- β est plus petite que celle d'un résidu Glycine dans un brin- β isolé. D'après les travaux de Chothia (Chothia, C. (1976)), la diminution de la surface accessible des atomes polaires du squelette polypeptidique suite à la formation des hélices- α et des feuillets- β à partir d'un brin- β isolé est d'environ 50 %. De plus, comme les atomes polaires du squelette polypeptidique de la PLA et de la PLL sont impliqués dans des liaisons-H, leur hydratation doit être nécessairement diminuée par rapport à un brin- β isolé. Cependant, même impliqués dans des liaisons-H avec les groupement NH, les atomes d'O des carbonyles des liaisons peptidiques peuvent former des liaisons-H avec les molécules d'eau environnantes *via* leurs doublets d'électrons libres (Thanki *et al.* (1991)). De plus, une diminution supplémentaire de la surface accessible des atomes polaires du squelette polypeptidique est à prévoir pour la PLA et la PLL en raison de la taille plus importante des chaînes latérales de l'Alanine et de la Leucine comparativement à la Glycine. Comme l'énergie libre d'hydratation des atomes polaires d'une protéine est proportionnelle à leur surface accessible (Privalov et Mahhatadze (1993)), l'énergie libre d'hydratation des atomes

polaires de la PLA et de la PLL à l'interface air-eau devrait être nécessairement inférieure à -0,82 kcal/mol.

Il nous est cependant impossible, à ce stade, de quantifier l'hydratation relative du squelette polypeptidique en fonction de la conformation et de la taille de la chaîne latérale. D'un autre côté, l'approche que nous proposons devrait tenir compte de façon intrinsèque de l'hydratation *in situ* des résidus en contact avec la surface aqueuse. De plus, comme la réduction de la surface accessible des atomes polaires du squelette polypeptidique est du même ordre de grandeur pour le passage d'un brin- β isolé vers une hélice- α et un feuillet- β , tel que montré par Chothia (Chothia, C. (1976)), l'hydratation d'un feuillet- β et d'une hélice- α devraient être, en première approximation, semblable. Dans cet ordre d'idée, Thanki et collaborateurs (Thanki *et al.* (1991)) ont montré, par l'analyse d'une série de structures protéiques cristallines de hautes résolutions, que l'hydratation des atomes d'oxygène des liaisons peptidiques des squelettes polypeptidiques exposés à la surface des protéines globulaires, est semblable pour le feuillet- β et l'hélice- α . Cependant, l'effet de la taille des chaînes latérales n'a pas pu être vérifié.

Il existe un autre effet qui pourrait mener à un écart entre les valeurs de ΔG_{stab} effectifs mesurées selon notre approche et les ΔG_{tr} estimés par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska. De la même façon que pour la surface accessible des atomes polaires du squelette polypeptidique, la surface

accessible des chaînes latérales dans un feuillet- β et dans une hélice- α est plus petite que celle qu'on retrouve dans un acide aminé libre ou dans un brin- β isolé. De façon générale, la diminution de la surface accessible d'une chaîne latérale est plus grande pour un feuillet- β que pour une hélice- α (Chothia, C. (1976)). Comme la contribution des chaînes latérales hydrophobes à la force de l'interaction hydrophobe est proportionnelle à leur surface accessible, une diminution de leur surface accessible diminuerait l'énergie libre défavorable associée à l'organisation des molécules d'eau en contact avec les chaînes latérales à l'interface. De la même façon, une diminution de la surface accessible de la chaîne latérale diminuerait l'étendue des interactions de type van der Waals entre les chaînes latérales dans la bicouche ainsi qu'à l'interface des structures tertiaires à l'intérieur des protéines.

De plus, la perte d'entropie conformationnelle que les chaînes latérales pourraient subir lors de leur transfert de la surface aqueuse vers la bicouche, à l'instar de leur enfouissement vers l'intérieur d'une protéine globulaire, pourrait aussi contribuer à expliquer l'écart entre les ΔG_{tr} et les ΔG_{stab} mesurés. Mais, comme Pickett et Sternberg l'on montré, cette perte d'entropie conformationnelle est nulle pour une chaîne latérale d'Alanine (Pickett et Sternberg (1993)). Par contre, la perte d'entropie conformationnelle que les chaînes latérales de la PLL subiraient lors de leur transfert de l'interface vers la bicouche pourrait significativement ajouter à l'écart entre la valeur de ΔG_{stab} effectif que nous mesurons et la valeur de

ΔG_{tr} mesurée pour la chaîne latérale seulement. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1, l'effet déstabilisant de cette perte d'entropie conformationnelle serait d'environ 0,7 kcal/mol pour la chaîne latérale de la Leucine à la température de la pièce.

Cependant, puisque la surface accessible de la chaîne latérale est diminuée à l'intérieur des structures secondaires, il est possible que cette perte d'entropie conformationnelle soit plus faible pour une chaîne latérale transférée de l'eau vers une bicouche à l'intérieur d'un feuillet- β ou d'une hélice- α que pour une chaîne latérale qui s'enfouit vers l'intérieur d'une protéine globulaire à partir d'une organisation non-ordonnée de la chaîne polypeptidique telle qu'assumée dans les travaux de Pickett et Sternberg (Pickett et Sternberg (1993)).

En effet, une perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales lors de la formation d'une hélice- α à partir d'une conformation étendue a été rapportée (Creamer et Rose (1992)). Par contre, ces auteurs ont montré que cette perte d'entropie conformationnelle pour la chaîne latérale de la Leucine est négligeable et que celle de la chaîne latérale de l'Alanine est nulle. La déstabilisation résultante fut estimée à 0,04 kcal/mol pour la chaîne latérale de la Leucine à la température de la pièce (Creamer et Rose (1992)). Nous n'avons pu trouver dans la littérature d'études semblables sur la perte d'entropie conformationnelle que pourraient subir les chaînes latérales lors de la formation d'un feuillet- β à partir de brins- β isolés.

Cependant comme la diminution de la surface accessible des chaînes latérales est plus importante pour la formation d'un feuillet- β , la perte d'entropie conformationnelle pourrait être plus importante que celle estimée pour la formation d'une hélice- α . Par contre, sur la base du fait que l'écart entre la valeur de ΔG_{stab} que nous mesurons pour un résidu Leucine et les ΔG_{tr} correspondants de la chaîne latérale, est plus grand que l'écart entre la valeur de ΔG_{stab} que nous mesurons pour un résidu Alanine et les ΔG_{tr} correspondants de la chaîne latérale, nous croyons que la perte d'entropie conformationnelle que les chaînes latérales de Leucine subissent lors du transfert de l'interface vers la bicouche n'est pas négligeable.

Ainsi, l'obtention de valeurs de ΔG_{stab} effectifs pour le transfert de résidus Leucine et Alanine de l'interface vers une bicouche plus faibles que les valeurs de ΔG_{tr} de la chaîne latérale correspondante, telles qu'obtenues par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska, pourrait s'expliquer par: 1) une hydratation partielle des squelettes polypeptidiques de la PLL et de la PLA à la surface aqueuse, 2) par une perte d'entropie conformationnelle de la chaîne latérale (pour la Leucine seulement) et 3) une diminution de la surface accessible de la chaîne latérale dans les structures secondaires par rapport aux acides aminés libres et aux analogues acétyle amides. Evidemment, ces différents effets devraient aussi intervenir lors de la formation des structures tertiaires des protéines globulaires. Dans cet optique, il apparaît que les ΔG_{tr} des chaînes latérales représentent certainement une surestimation de la contribution réelle des résidus

hydrophobes à la stabilisation de la structure tertiaire des protéines globulaires. Nous représentons schématiquement, à la Fig. 41, les différents effets qui devraient contribuer à diminuer les ΔG_{tr} des chaînes latérales.

Nous verrons dans le prochain paragraphe que les valeurs de ΔG_{stab} effectifs que nous mesurons pour les résidus Alanine et Leucine se comparent bien avec les valeurs de ΔG_{tr} correspondantes évaluées à partir d'une approche plus réaliste que l'approche employée par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska pour évaluer la contribution des différents résidus à l'interaction hydrophobe.

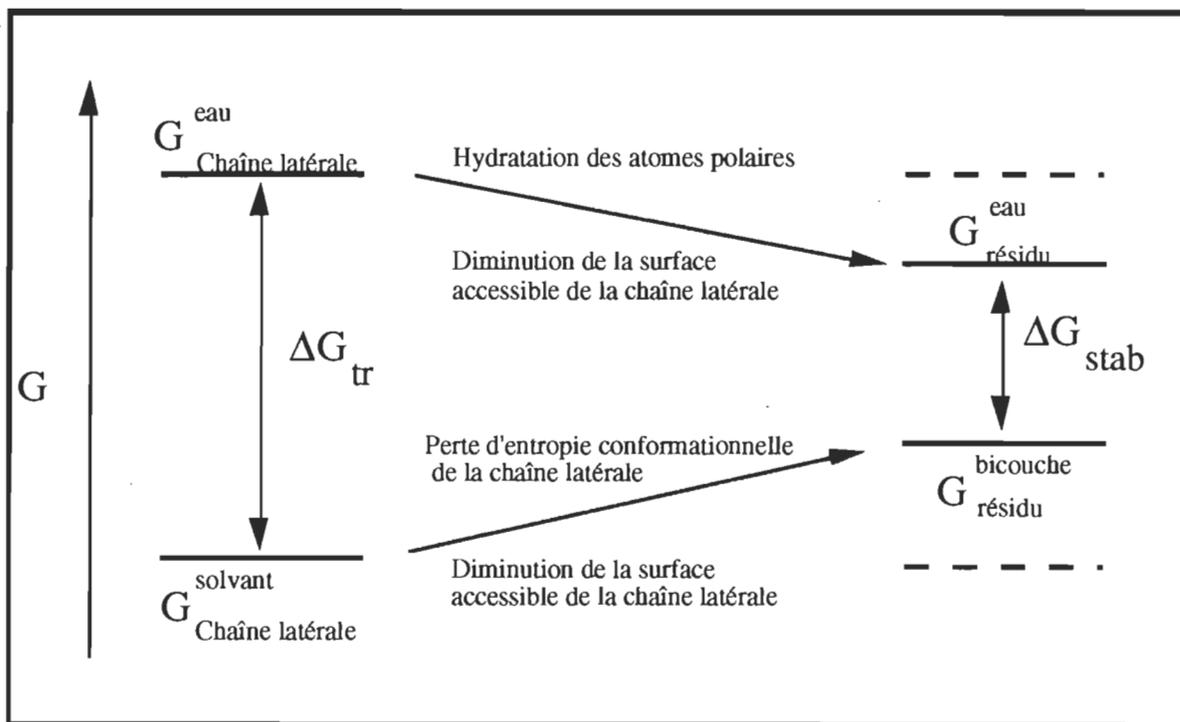


Figure 41. Représentation schématisée des différents effets pouvant mener à une différence entre les valeurs de ΔG_{tr} de Nozaki-Tanford et Fauchère-Pliska et les valeurs de ΔG_{stab} effectifs mesurés par notre approche.

Dans cette approche, les ΔG_{tr} sont estimées à partir de coefficients de partition (K) empiriques des différents résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur des protéines globulaires à partir des coordonnées atomiques de protéines globulaires (Miller *et al.* (1987)). Ces ΔG_{tr} empiriques ont été évalués à partir de la relation suivante: $-RT \ln K$. Les valeurs de ΔG_{tr} ainsi obtenues pour les résidus Alanine et Leucine sont respectivement 0,2 et 0,65 kcal/mol. Comme nous pouvons le constater (voir Tableau 7), ces valeurs sont aussi inférieures à celles de Nozaki et Tanford et celles de Fauchère et Pliska pour les chaînes latérales mais comparables à celles que nous obtenons. Les valeurs de ΔG_{tr} empiriques que Miller et collaborateurs obtiennent pour les différents résidus hydrophobes sont systématiquement plus faibles que les valeurs de ΔG_{tr} des chaînes latérales correspondantes.

À partir de cette observation, Miller et collaborateurs concluent que la partition des différents résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur des protéines globulaires ainsi que leur contribution à la stabilité de ces dernières, dépendent de facteurs autres que de l'hydrophobicité des chaînes latérales seulement. Un de ces facteurs pourrait être l'énergie libre d'hydratation des atomes polaires des résidus. En effet, ces ΔG_{tr} empiriques peuvent être vus comme le travail nécessaire pour amener un résidu de l'intérieur de la protéine globulaire vers sa surface où les atomes polaires des résidus peuvent être hydratés tout comme les valeurs que nous obtenons peuvent être vues comme le travail nécessaire pour amener un résidu de

l'intérieur de la bicouche vers la surface aqueuse où il peut aussi être hydraté. De plus, les valeurs de Miller et collaborateurs semblent aussi tenir compte, de façon intrinsèque, de la perte d'entropie conformationnelle de la chaîne latérale. En effet, Pickett et Sternberg ont montré que la corrélation entre les valeurs de Miller et collaborateurs et celles de Fauchère et Pliska est augmentée lorsque ces dernières sont entachées de la variation d'énergie libre défavorable associée à la perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales (Pickett et Sternberg (1993)).

Ainsi, sur la base du fait que les valeurs de ΔG_{stab} effectifs que nous avons mesurées pour les résidus Alanine et Leucine sont comparables aux ΔG_{tr} obtenus par Miller et collaborateurs, la stabilisation des bicouches d'homopolypeptides hydrophobes à l'interface air-eau représente, à notre avis, un modèle réaliste pour évaluer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires. Certes, la stabilisation des protéines globulaires résulte en grande partie de l'entassement de chaînes latérales hydrophobes à l'interface des structures tertiaires. Cependant, comme l'intérieur d'une protéine ressemble davantage à un solide qu'à un liquide, la contribution favorable due à l'hydrophobicité (ΔG_{tr}) des chaînes latérales doit être amputée de la variation d'énergie libre défavorable associée à leur perte d'entropie conformationnelle (Pickett et Sternberg (1993)). De plus, suite à la formation de la structure secondaire, la surface accessible des chaînes latérales est diminuée par rapport à leur surface accessible dans un acide

aminé ou dans les analogues acétyles amides faisant en sorte que leur contribution à l'interaction hydrophobe à l'interface des structures tertiaires est nécessairement plus petite que ce que les ΔG_{tr} laissent présager. Ainsi, l'hydrophobicité des résidus est nécessairement plus faible que l'hydrophobicité des chaînes latérales, étant donné que les atomes polaires du squelette polypeptidique peuvent être favorablement hydratés.

Cependant, les valeurs de ΔG_{tr} obtenues par Miller et collaborateurs ne tiennent pas compte de la conformation dans laquelle se retrouvent les différents résidus. En ce sens, elles représentent probablement des valeurs moyennes pour l'ensemble des conformations différentes dans laquelle se retrouvent les différents résidus à l'intérieur et à la surface des protéines. Les atomes polaires des résidus se trouvant au centre des boucles- β ou autres boucles reliant les feuillets- β et les hélices- α et les hélices- α entre-elles à la surface des protéines, ne sont pas impliqués dans des liaisons-H intra-moléculaires (Creighton, T. E. (1993) et Efimov, A. V. (1993)). En conséquence, leur surface accessible est nécessairement plus grande que celle des atomes polaires des résidus qui se retrouvent dans des feuillets- β et des hélices- α et, de ce, fait sont probablement mieux hydratés à la surface des protéines. Ce fait pourrait expliquer en partie pourquoi les valeurs de Miller et collaborateurs sont plus faibles que les valeurs que nous obtenons. En effet, la quantité de boucles- β dans les films de PLA que nous avons étudiés était pratiquement nulle. De plus, il est possible que les atomes polaires des résidus centraux des boucles- β dans les films de PLL soient

impliqués dans des liaisons-H inter-moléculaires diminuant ainsi leur hydratation.

D'un autre côté, ces boucles- β constituent une des limitations de l'approche que nous proposons. Comme nous l'avons mentionné plus tôt, il est difficile de spécifier le type de boucles- β présent dans les films de même que leur orientation à l'interface air-eau. Par conséquent, la fraction de résidus transférés de la surface aqueuse vers la bicouche est entachée d'une incertitude qui se répercute nécessairement sur l'exactitude des ΔG_{stab} effectifs mesurés selon notre approche. Cette incertitude sera d'autant plus grande que le pourcentage de boucles- β dans les films sera élevé. Dans le cas des films de PLL que nous avons étudiés, cette incertitude sur le ΔG_{stab} effectif s'élève approximativement à 10%. De plus, une incertitude supplémentaire doit être considérée pour la valeur ΔG_{stab} effectif que nous avons mesuré pour les résidus Leucines étant donné que la fin de la transition monocouche-bicouche n'a pas pu être positionnée précisément. Dans les faits, nous avons extrapolé la fin de la transition à une aire résiduelle deux fois plus petite que celle du début. Bien que cette approximation nous apparaisse acceptable, il n'en demeure pas moins que la valeur de B_f et, par conséquent, la valeur de ΔG_{stab} apparent extrapolée à $B_f = 1$ puisse être sous-estimée ou même surestimée. Un écart de 1,0 Å²/résidu dans un sens ou dans l'autre implique une erreur d'environ 10 % sur les valeurs de B_f et la valeur de ΔG_{stab} apparent extrapolée à $B_f = 1$. Néanmoins, même entachée d'une erreur relative maximale de 30 %

attribuable aux incertitudes relatives sur les ΔG_{stab} (10% au maximum) sur le 10 % de boucles- β et sur l'incertitude du positionnement de la fin de la transition monocouche-bicouche, la valeur de ΔG_{stab} effectif mesurée pour le résidu Leucine selon notre approche est significativement inférieure aux valeurs de ΔG_{tr} de Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska.

Comme le pourcentage de boucles- β dans les films de PLA que nous avons étudiés est à toute fin pratique nulle et que la fin de la transition monocouche-bicouche est clairement identifiable sur son isotherme Π -A, la différence entre le ΔG_{stab} effectif pour un résidu Alanine que nous mesurons et les valeurs de ΔG_{tr} pour la chaîne latérale seulement, est probablement significative.

5.5 Conclusion

Nous avons montré dans de ce chapitre qu'il est possible de mesurer la contribution des résidus Leucine et Alanine à la stabilisation des bicouches de PLA (organisée majoritairement en hélice- α) et de PLL (organisée majoritairement en feuillet- β antiparallèle) à partir des boucles d'hystérèse enregistrées lors de cycles de compression-expansion effectués durant leurs transitions monocouche-bicouche. Ainsi que nous l'avons montré, ces boucles d'hystérèse observées sur les isothermes Π -A de la PLA et de la PLL résultent de la stabilisation des bicouches par l'interaction hydrophobe. L'intégration de la surface délimitée par ces boucles d'hystérèse est en fait une mesure de l'énergie libre de stabilisation des bicouches de PLA et de

PLL. De plus, en tenant compte de la fraction de résidus initialement en contact avec la phase aqueuse et qui dépend de la conformation des homopolypeptides, il est possible de pondérer l'énergie libre de stabilisation des bicouches de façon à ce que l'énergie libre de stabilisation résultant de l'interaction hydrophobe (ΔG_{stab}) attribuable au transfert de résidus de la surface aqueuse vers la bicouche puisse être évaluée. Ces valeurs de ΔG_{stab} pour les résidus Leucine et Alanine furent ainsi respectivement évaluées à 0,87 et 0,34 kcal/mol de résidus

Ces valeurs sont plus faibles que les valeurs de ΔG_{tr} pour les chaînes latérales correspondantes mesurées par Nozaki et Tanford et Fauchère et Pliska. Ainsi que nous l'avons discuté, les valeurs de ΔG_{tr} des chaînes latérales représentent à notre avis une surestimation de la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des protéines globulaires car elles occultent certaines forces importantes qui tendent à déstabiliser les protéines globulaires. Parmi ces forces, nous avons souligné la perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales et l'hydratation favorable du squelette polypeptidique. Nous avons aussi discuté du fait que ces forces devraient être incluses de façon intrinsèque dans les valeurs de ΔG_{stab} mesurées selon notre approche. En accord avec ce fait, nous avons montré que les valeurs de ΔG_{stab} que nous avons mesurées se comparent bien avec les valeurs correspondantes d'une échelle empirique de ΔG_{tr} établie à partir de la partition des résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur hydrophobe des protéines globulaires et qui semblent tenir compte, de façon

intrinsèque de l'hydratation des atomes polaires du squelette polypeptidique et de la perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales.

CHAPITRE 6

CONCLUSION GENERALE

Nous avons étudié, au chapitre 3, l'organisation du Poly- γ -Benzyl-L-Glutamate (PBLG) sous sa conformation α -hélicoïdale à des valeurs élevées d'aire résiduelles ainsi qu'au début de la transition monocouche-bicouche observée sur son isotherme Π -A. À l'aide du modèle que nous présentons et que nous avons développé pour calculer la distance entre des hélices- α ainsi que l'aire résiduelle correspondante pour différentes conformations des chaînes latérales, nous suggérons un mode d'interaction entre les hélices de PBLG différent de celui présumé dans la littérature. Il est proposé, dans la littérature (Malcolm, B. R. (1973)), que les hélices- α de PBLG sont interdigitées avec une conformation étendue des chaînes latérales au début de la transition monocouche-bicouche. De notre côté, nous proposons plutôt que les hélices- α de PBLG s'entassent avec une conformation repliée des chaînes latérales, positionnant ainsi les noyaux benzyles (près du squelette polypeptidique de l'hélice) dans une orientation propice à l'établissement d'interactions benzyles-benzyles enthalpiquement favorables. Nous montrons que pour une telle organisation des chaînes latérales, l'aire

résiduelle limite du PBLG est plus susceptible d'atteindre la valeur observée au début de la transition monocouche-bicouche que pour une organisation étendue et interdigitée des chaînes latérales.

De plus, nous avons montré, par microscopie à épifluorescence et par l'analyse du moment dipolaire (μ_{\perp}) calculé à partir des valeurs de ΔV enregistrées avant le début de la transition monocouche-bicouche que les molécules de PBLG s'auto-organisent spontanément en formant des agrégats incompressibles aux grandes valeurs d'aires résiduelles. Cette auto-organisation de même que l'incompressibilité des agrégats montrent que les interactions inter-hélices sont fortes et pourraient bien être le résultat du type d'interaction que nous proposons. D'autre part, nous montrons, qu'entre le point de décollement de Π et le début de la transition monocouche-bicouche, que l'isotherme ΔV -A enregistrée peut s'expliquer par un entassement progressif des agrégats à l'intérieur desquels l'entassement des molécules de PBLG serait identique à celui dont nous proposons l'existence au début de la transition monocouche-bicouche.

L'approche que nous proposons pour mesurer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires, nécessite la connaissance du début et de la fin de la transition monocouche-bicouche des homopolypeptides étudiés et de la fraction de résidus en contact avec la surface aqueuse. Cette dernière fraction dépend

directement de la conformation des homopolypeptides étudiés à l'interface air-eau.

Nous avons déterminé la conformation à l'interface air-eau des deux homopolypeptides dont nous avons étudié la stabilisation, *i.e.* la Poly-L-Alanine (PLA) et la Poly-L-Leucine (PLL) à l'aide de la position et de la simulation des composantes de la bande Amide I des spectres infrarouges de leurs films Langmuir-Blodgett que nous avons obtenus par FTIR-MIR. Nous montrons ainsi que la PLA est organisée majoritairement en hélice- α (approximativement 90 %) avec une faible proportion organisée en feuillet- β (approximativement 10 %) à l'interface air-eau lorsqu'elle y est étalée à partir d'une solution à 6 % (vol:vol) d'acide dichloroacétique dans le chloroforme. De la même façon, nous avons montré que la PLL est majoritairement organisée en feuillet- β antiparallèle (approximativement 80 %) avec possiblement 10 % des résidus organisés en boucles- β et 10 % en hélice- α lorsqu'elle est étalée à l'interface air-eau à partir d'une solution à 20 % (vol:vol) d'acide trichloroacétique dans le chloroforme. Ainsi que nous le discutons, l'organisation de la PLL à l'interface sous une conformation majoritairement composée de feuillets- β antiparallèles et la faible proportion de feuillet- β observée dans les films de PLA proviendraient de la déstabilisation de la conformation α -hélicoïdale par les acides organiques, nécessaires à leur solubilisation et ainsi utilisés dans le solvant d'étalement.

Nous avons proposé, au chapitre 4 que les transitions monocouche-bicouche de la PLA (organisée majoritairement en hélice- α) et de la PLL (organisée majoritairement en feuillet- β antiparallèle) se déroulent en deux étapes successives et graduelles. Cette idée est nouvelle puisque le modèle utilisé jusqu'à maintenant consistait en une transition en une seule étape pour des films d'homopolypeptides hydrophobes organisés majoritairement en hélice- α ou majoritairement en feuillet- β . En effet, nous avons mis en évidence une transition de phase supplémentaire d'ordre second précédant celle normalement attribuée à la transition monocouche-bicouche sur les isothermes Π -A de la PLA et de la PLL. À l'aide de notre modèle pour calculer l'aire résiduelle pour des hélices- α et des paramètres structuraux concernant les feuillets- β , nous avons attribué au début des ces transitions de phase inédites le début des transitions monocouche-bicouche.

La première transition observée sur l'isotherme Π -A de la PLA débute vers $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Cette dernière valeur d'aire résiduelle correspond, à 4 % près, à l'aire résiduelle calculée ($13,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) pour un film de PLA composé de 90 % d'hélices- α interdigitées et de 10 % de feuillets- β entassés de façon optimale. Comme cette organisation correspond à un entassement bidimensionnel limite des molécules de PLA, il nous apparaît logique que la transition monocouche-bicouche de la PLA devrait débiter à cette valeur d'aire résiduelle. De la même façon, le début de la première transition de phase observée sur l'isotherme Π -A de la PLL vers $16,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ correspond étroitement à l'aire résiduelle de $16,6 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ que nous

calculons pour une organisation de la PLL avec 90 % de feuillets- β antiparallèles (en incluant le 10 % de boucles- β) entassés de façon optimale et 10 % d'hélices- α interdigitées. Ainsi, il apparaît évident que le film de PLL se retrouve dans un état d'entassement optimal en deux dimensions au début de cette transition indiquant du même coup que la transition monocouche-bicouche de ce polypeptide devrait y être initiée.

De plus, nous observons, sur les isothermes ΔV -A de la PLA et de la PLL, des pseudo-plateaux de ΔV débutant aux mêmes aires résiduelles qu'où nous observons les débuts des premières transitions de phases d'ordre second sur leurs isothermes Π -A. Nous montrons, par l'analyse de l'allure des isothermes ΔV -A que nous avons enregistrées, que le début des pseudo-plateaux devraient coïncider avec un état d'entassement limite des molécules de PLL et de PLA. Ainsi, cette analyse vient appuyer la position du début des transitions monocouche-bicouche sur les isothermes Π -A de la PLA et de la PLL que nous avons déterminée.

Ainsi, du point de vue du mécanisme de la transition monocouche-bicouche de la PLA et de la PLL, l'existence de deux transitions de phase d'ordre second sur leurs isothermes Π -A, nous indique que la transition s'effectue en deux étapes graduelles et qu'il doit exister un état intermédiaire à la fin des premières transitions. Pour la PLA, la fin de la première transition est observée vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$. Nous montrons qu'il est possible de modéliser, pour une organisation en hélices- α de la PLA, cet

état intermédiaire où une hélice sur deux est exclue de la surface aqueuse. Ainsi, nous proposons que la première transition observée sur l'isotherme Π -A de la PLA correspondrait à l'exclusion progressive de la surface aqueuse des molécules qui formeront la seconde couche. L'organisation de la PLL à la fin de la première transition observée sur son isotherme Π -A vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ n'a pu être modélisée précisément parce que l'organisation de feuillets- β en trois dimensions est géométriquement difficile à modéliser. Néanmoins, comme la formation d'une bicouche de feuillets- β nécessite le bris de liaisons-H, nous proposons que la première transition correspondrait au bris des liaisons-H inter-feuillets et à l'éjection graduelle de la surface aqueuse des feuillets- β qui formeront la seconde couche.

Les secondes transitions correspondraient alors à la formation des bicouches de PLA et de PLL à partir des états intermédiaires proposés, et, au cours de laquelle, on assisterait à la formation graduelle de nouvelles interactions intermoléculaires favorables entre les chaînes latérales hydrophobes au sein de la bicouche.

Cette seconde étape débute vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ et prend fin vers $6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ sur l'isotherme Π -A de la PLA. Ainsi, à $6,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, l'existence d'une bicouche complète de PLA est proposée. Comme l'aire résiduelle de la bicouche correspond à la moitié de l'aire résiduelle calculée

au début de la première transition ($13,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$), cette proposition est tout à fait justifiée.

La fin de la seconde transition débutant vers $14,0 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ sur l'isotherme Π -A de la PLL n'a pu être enregistrée pour des raisons techniques que nous avons discutées au chapitre 4.

Nous montrons, par ailleurs, que le mécanisme de transition monocouche-bicouche proposé permet d'expliquer en partie le comportement du ΔV durant les pseudo-plateaux.

Nous avons montré, au cours du chapitre 5, qu'il est possible de mesurer la contribution des résidus Leucine et Alanine à la stabilisation des bicouches de PLA (organisée majoritairement en hélices- α) et de PLL (organisée majoritairement en feuillets- β antiparallèles) à partir des boucles d'hystérèse enregistrées lors de cycles de compression-expansion effectués durant leurs transitions monocouche-bicouche. Ainsi que nous l'avons montré, ces boucles d'hystérèse observées sur les isothermes Π -A de la PLA et de la PLL résultent de la stabilisation des bicouches de ces polypeptides par l'interaction hydrophobe résultant du transfert de résidus Alanine et Leucine de l'interface vers ces bicouches. L'intégration de la surface délimitée par ces boucles d'hystérèse est en fait une mesure de l'énergie libre de stabilisation des bicouches de PLA et de PLL.

Nous montrons, en accord avec le mécanisme de transition monocouche-bicouche que nous proposons, que la stabilisation des bicouches de PLA et de PLL s'effectue de façon biphasique et graduelle.

En tenant compte de la fraction de résidus initialement en contact avec la phase aqueuse, il est possible de pondérer l'énergie libre de stabilisation des bicouches de façon à ce que celle résultant de l'interaction hydrophobe (ΔG_{stab}) associée au transfert de résidus de la surface aqueuse vers la bicouche puisse être évaluée. Ces valeurs de ΔG_{stab} pour les résidus Leucine et Alanine furent ainsi respectivement évaluées à 0,87 et 0,34 kcal/mol de résidus.

Comme nous l'avons discuté, la formation de bicouches d'homopolypeptides hydrophobes se rapproche conceptuellement de la formation de la structure tertiaire des protéines globulaires. Ainsi, la contribution à la stabilisation des bicouches d'homopolypeptides hydrophobes des résidus hydrophobes transférés de la surface aqueuse vers la bicouche représente un modèle expérimental réaliste pour l'étude de la stabilisation des protéines globulaires qui repose essentiellement sur un entassement serré de chaînes latérales hydrophobes à l'interface de leurs structures tertiaires.

De façon classique, la force de l'interaction hydrophobe, responsable de la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires, est

souvent approximée à l'aide des ΔG_{tr} des chaînes latérales hydrophobes de Nozaki et Tanford et de Fauchère et Pliska. Cependant, comme nous l'avons discuté, les valeurs de ΔG_{tr} des chaînes latérales hydrophobes représentent, à notre avis, une surestimation de la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation des protéines globulaires. En effet, comme ces ΔG_{tr} ne tiennent compte que de la chaîne latérale et que, dans ce modèle, l'intérieur hydrophobe des protéines globulaires est mimé par un solvant organique, nous avons montré que ces ΔG_{tr} ne peuvent tenir compte de certaines forces importantes et qui tendent à déstabiliser les protéines globulaires. Parmi ces forces, nous avons souligné la perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales et l'hydratation favorable du squelette polypeptidique. Nous avons aussi discuté du fait que ces forces devraient être incluses de façon intrinsèque dans les valeurs de ΔG_{stab} mesurées selon notre approche. En accord avec ce dernier fait, nous avons montré que les valeurs de ΔG_{stab} que nous avons mesurées se comparent bien avec les valeurs correspondantes d'une échelle empirique de ΔG_{tr} établie à partir de la partition des résidus hydrophobes entre la surface et l'intérieur hydrophobe des protéines globulaires et qui semble tenir compte, de façon intrinsèque, de l'hydratation des atomes polaires du squelette polypeptidique et de la perte d'entropie conformationnelle des chaînes latérales.

Dans un contexte plus global, nous avons montré que l'approche que nous proposons peut renseigner sur la stabilisation des structures tertiaires des protéines globulaires. Elle ne peut cependant pas nous renseigner sur

l'énergétique de la stabilisation des structures secondaires. D'un autre côté, nous avons mentionné, au chapitre 1, que la dénaturation thermique des protéines globulaires de poids moléculaires plus petits que 20 kDa est un processus hautement coopératif et réversible (Privalov, P. L. (1979) et Freire et Murphy (1991)). Ce résultat implique que le repliement (et la dénaturation thermique) de ce type de protéines globulaires est représenté par un équilibre n'impliquant que les états natif et dénaturé des protéines. Ainsi, il apparaît que la stabilité des intermédiaires et des structures secondaires repose sur la formation et la stabilisation de la structure tertiaire (Freire et Murphy (1991)). Dans ce contexte, l'approche que nous proposons s'avère, à notre avis, une avenue nouvelle et réaliste pour l'étude de la contribution des différents résidus hydrophobes à la stabilité des protéines globulaires constituées essentiellement de feuillets- β ou d'hélices- α .

BIBLIOGRAPHIE

Alber, T. "Mutational effects on protein stability." Ann. Rev. Biochem. 1989, 58, 765-798.

Alber, T., Dao-Pin, S. Wilson, K. Wosniak, J. A., Cook, S. P. et Mathews, B. W. "Contribution of hydrogen bonds of Thr 157 to the thermodynamic stability of phage T4 Lysozyme." Nature 1987, 330, 41-46.

Albert, A. et Cordoba, J. "Pure and mixed monolayers of poly-L-methionine and poly- γ -methyl-L-glutamate with 1,2 dioleoyl-L- α -phosphatidylcholine at the air-water interface." Colloid and Polymer Sci. 1984, 262, 811-816.

Arnott, S. et Dover, S. D. "Refinement of bond angles of an α -helix." J. Mol. Biol. 1967, 30, 209-212.

Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J. et Goni, F. M. "Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy." Prog. Biophys. Molec. Biol. 1993, 49, 23-56.

Ashida, T., Tanaka, I. et Yamane, T. “ β -pleated sheets in oligopeptide crystals.” Int. J. Peptide Protein Res. 1981, 17, 322-329.

Aveyard, R. et Haydon, D. A. “An introduction to the principles of surface chemistry.” London: Cambridge University Press, 1973.

Baglioni, P., Gallori, E., Gabrielli, G. et Ferroni, E. “Bidimensional state conformation of poly- γ -methyl-glutamate. I. α , β -conformation and their mixtures with arachidic acid.” J. Colloid Interface Sci. 1982, 88, 221-232.

Baglioni, P., Dei, L. et Gabrielli, G. “Bidimensional state conformation of poly- γ -methyl-L-glutamate. II. Collapse mechanism of α and β conformations.” J. Colloid Interface Sci. 1983, 93, 403-410.

Baker, E. N. et Hubbard, R. E. “Hydrogen bonding in globular proteins.” Prog. Biophys. Molec. Biol. 1984, 44, 97-179.

Baldwin, R. L. “Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 8069-8072.

Blodgett, K. B. “Films built by depositing successive layers on a solid surface.” J. Am. Chem. Soc. 1935, 57, 1007-1022.

Bockris, J. O'M. et Reddy, A. K. N. “Modern electrochemistry”, Tomes 1 et 2 New York: Plenum Press, 1977.

Brooks, C. L., Karplus, M. & Pettitt, B. M. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics." *Advances in Chemical Physics Series* vol. LXXI. New York: Wiley, 1988.

Brullemans, M. "Étude des potentiels électrostatiques de membranes asymétriques du type Montal-Muller: Contributions expérimentales et théoriques." Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, 1991.

Burley, S. K. et Petsko, G. A. "Weakly polar interactions in proteins." Adv. Protein Chem. 1988, 39, 125-189.

Chothia, C. "Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins." Nature 1974, 248, 338-339.

Chothia, C. "The nature of the accessible surface and buried surface in proteins." J. Mol. Biol. 1976, 105, 1-14.

Chothia, C., Levitt, M. et Richardson, D. "Helix to Helix packing in proteins." J. Mol. Biol. 1981, 145, 215-250.

Chothia, C. "Principles that determine the structure of proteins." Ann. Rev. Biochem. 1984, 53, 537-572.

Chothia, C. et Finkelstein, A. V. "The classification and origins of protein folding patterns." Ann. Rev. Biochem. 1990, 59, 1007-1039.

Chou, K.-C., Némethy, G. et Scheraga, H. A. "Energetic approach to the packing of α -helices." J. Phys. Chem. 1983, 87, 2869-2881.

Cohen, C. et Parry, D. A. D. " α -helical coiled coils-a widespread motif in proteins." Trends Biochem. Sci. 1986, 11, 245-248.

Cohen, F. E., Sternberg, M. J. E. et Taylor, W. R. "Analysis of the tertiary structure of protein β -Sheet sandwiches." J. Mol. Biol. 1981, 148, 253-272.

Cornell, D. G. "Circular dichroism of polypeptide monolayers." J. Colloid Interface Sci. 1979, 70, 167-180.

Cox, R. A. et Katchalsky, A. "Hysteresis and conformational changes in ribosomal ribonucleic acid." Biochem. J. 1972, 126, 1039-1054.

Creamer, T. P. et Rose, G. D. "Side-chain entropy opposes α -helix formation but rationalizes experimentally determined helix-forming propensities." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, 89, 5937-5941.

Creighton, T. E. "Proteins, structure and molecular properties." (2nd ed.). New York: Freeman, 1993.

Crick, F. H. C. "Is α -keratin a coiled-coil?" Nature 1952, 170, 882-883.

Crick, F. H. C. "The packing of α -helices: Simple coiled-coils." Acta Cryst. 1953, 6, 689-697.

Denicourt, N. "La diffusion latérale des phospholipides en couche monomoléculaire." Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, 1990.

Dill, K. A. "Dominant forces in protein folding." Biochemistry 1990, 29, 7133-7155.

Ducharme, D. "Construction, mise au point d'un ellipsomètre et études ellipsométriques de phospholipides à l'interface air-eau." Thèse de doctorat, Université Laval, 1987.

Dunker, K. et Zaleske, D. J. "Stereochemical considerations for the constructing α -helical bundles with particular application to membrane proteins." Biochem. J. 1977, 163, 45-57.

Efimov, A. V. "Standard structures in proteins." Prog. Biophys. Molec. Biol. 1993, 60, 201-239.

Everett, D. H. et Whitton, W. I. "A general approach to hysteresis." Trans. Faraday Soc. 1952, 48, 749-757.

Fasman, D. G. (Ed) "Poly- α -amino acids. Protein models for conformational studies." New York: Marcel Dekker, Inc., 1967.

Fauchère, J.-L. et Pliska, V. "Hydrophobic parameters Π of amino-acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid-amides." Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther. 1983, 18, 369-375.

Freire, E. et Murphy, K. P. "Molecular basis of co-operativity in protein folding." J. Mol. Biol. 1991, 222, 687-698.

Freire, E. "Structural thermodynamics: prediction of protein stability and protein binding affinities." Arch. Biophys. Biochem. 1993, 303, 181-184.

Fu, L. et Freire, E. "On the origin of the enthalpy and entropy convergence temperatures in protein folding." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, 89, 9335-9338.

Gabrielli, G., Baglioni, P. et Ferroni, E. "On the mechanism of collapse of monolayers of macromolecular substances: poly(L, D, and DL) alanine." J. Colloid Interface Sci. 1981, 81, 139-149.

Gabrielli, G., Pugelli, M., Dei, L. et Domini, C. "Mixed monolayers of polypeptides." Coll. Polym. Sci. 1988, 266, 429-436.

Gaines, G. L. Jr. "Insoluble monolayers at liquid-gas interface." New York; Interscience publishers, 1966.

Gill, S. J., Dec, S. F., Olofsson, G. et Wadsö, I. "Anomalous heat capacity of hydrophobic solvation." J. Phys. Chem. 1985, 89, 3758-3761.

Grainger, D. W., Reichert, A., Ringsdorf, H. et Salesse, C. "An enzyme caught in action: direct imaging of hydrolytic function and domain formation of phospholipase A2 in phosphatidylcholine monolayers." FEBS Lett. 1989, 252, 365-379.

Harkins, W. D. "The physical chemistry of surface films." New York: Reinhold Publishing Corp, 1952.

Harrick, N. J. "Internal reflection spectroscopy." New York: John Wiley & Sons, 1967.

Israelachvili, J. N. "Intermolecular and surface forces.with applications to colloid and biological systems." London: Academic Press, 1985.

Itoh, K., Shimanouchi, T. et Oya, M. "Far-infrared spectra of poly(- α -amino acids) with basic alkyl group side chains." Biopolymers 1969, 7, 649-658.

IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature 1969. Biochemistry 1970, 9, 3471-3479.

Janin, J. et Chothia, C. "Stability and specificity of protein-protein interactions: the case of the trypsin-trypsin inhibitor complexes." J. Mol. Biol. 1976, 100, 197-211.

Janin, J., Miller, S. et Chothia, C. "Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins." J. Mol. Biol. 1988, 204, 155-164.

Kauzmann, W. "Some factors in the interpretation of protein denaturation." Adv. Protein Chem. 1959, 14, 1-63.

Kimura, F., Uematsu, S., Sakurai, H., Akhaori, Y. et Nakagaki, M. "The interaction between synthetic polypeptides and fatty acids at the air/water interface." J. Colloid Interface Sci. 1988, 124, 290-300.

Krimm, S. et Bandekar, J. "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins." Adv. Protein Chem. 1986, 38, 181-364.

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

Lavigne, P., Tancrede, P., Lamarche, F. et Max, J.-J. "Packing of hydrophobic α -helices: A study at the air/water interface." Langmuir 1992, 8, 1988-1993.

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

Lee, B. et Richards, F. M. "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility." J. Mol. Biol. 1971, 55, 379-400.

Livingstone, J. R., Spolar, R. S. et Record, M. T. "Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area." Biochemistry 1991, 30, 4237-4244.

Makhatadze, G. I. et Privalov, P. L. "Contribution of hydration to protein folding thermodynamics I. The enthalpy of hydration." J. Mol. Biol. 1993, 232, 639-659.

Malcolm, B. R. "Molecular structure and deuterium exchange in monolayers of synthetic polypeptides." Proc. Roy. Soc. A. 1968, 305, 363-385.

Malcolm, B. R. "Studies of synthetic polypeptide-water interactions using monolayer techniques." J. Polymer Sc. Part C 1971, 34, 87-99.

Malcolm, B. R. "The structure and properties of monolayers of synthetic polypeptides at the air-water interface." Prog. Surf. Membr. Sci. 1973, 7, 183-229.

Malcolm, B. R. "Hydrophobic side chain interactions in synthetic polypeptides and proteins at the air-water interface." Adv. Chem. Ser. 1975, 145, 338-359.

Malcolm, B. R. "Studies of the flow of molecular monolayers during compression and the effect of a plateau in the pressure area curves." Thin Solid Films 1985 a, 134, 201-208.

Malcolm, B. R. "The flow and deformation of synthetic polypeptide monolayers during compression." J. Colloid Interface Sci. 1985 b, 104, 520-529.

Matthews, B. W. "Structural and genetic analysis of protein stability" Ann. Rev. Biochem. 1993, 62, 39-160.

Miller, S., Janin, J., Lesk, A. M. et Chothia, C. "Interior and surface of monomeric proteins." J. Mol. Biol. 1987, 196, 641-656.

Momany, F. A., McGuire, R. F., Burgess, A. W., et Scheraga, H. A. "Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, non bonded interactions, hydrogen bond interactions and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids." J. Phys. Chem. 1975, 79, 2361-2381.

Motschmann, H., Reiter, R., Lawall, R., Duda, G., Stamm, M., Wegner, G. et Knoll, W. "Ellipsometric characterization of Langmuir monolayers of "hairy rod" polymers at the air-water interface." Langmuir 1991, 7, 2743-2747.

Murphy, K. P. et Freire, E. "Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins." Adv. Protein Chem. 1992, 43, 313-361.

Murphy, K. P. et Gill, S. J. "Group additivity for dissolution of solid cyclic dipeptides into water." Thermochim. Acta 1990, 172, 11-20.

Némethy, G., Leach, S. J. et Scheraga, H. A. "The influence of amino acid side-chain on the free energie of helix-coil transition." J. Phys. Chem. 1966, 70, 998-1004.

Nozaki, Y. et Tanford, C. "The solubility of amino acid and two glycine peptides in aquous ethanol and dioxane solutions." J. Biol. Chem. 1971, 246, 2211-2217.

Oobatake, M. et Ooi, T. "Hydration and heat stability effects on protein unfolding." Prog. Biophys. Molec. Biol. 1993, 69, 237-284.

Ooi, T. et Oobatake, M. "Prediction of the thermodynamics of protein unfolding: The helix-coil transition of poly(L-alanine)." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991, 88, 2859-2863.

Ooi, T., Oobatake, M., Némethy, G. et Scheraga, H. A. "Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, 84, 3086-3090.

Parry, D. A. D. et Suzuki, E. "Interchain packing energies of multistranded α -helical ropes." Biopolymers, 1969, 7, 199-206.

Pauling, L., Corey, R. B. et Branson, H. R. "The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1951, 37, 205-211.

Pauling, L. et Corey, R. B. "Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1951, 37, 729-740.

Pickett, S. D. et Sternberg, M. J. E. "Empirical scale of side-chain conformational entropy in protein folding." J. Mol. Biol. 1993, 231, 825-839.

Privalov, P. L. "Stability of proteins, small globular proteins." Adv. Protein Chem. 1979, 33, 167-241.

Privalov, P. L. et Gill, S. J. "Stability of protein structure and hydrophobic interactions." Adv. Protein Chem. 1988, 39, 191-234.

Privalov, P. L. et Khechinashvili, N. H. "A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure." J. Mol. Biol. 1974, 86, 665-684.

Privalov, P. L. et Makhatadze, G. I. "Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration." J. Mol. Biol. 1993, 232, 660-679.

Revzin, A., Neumann, E. et Katchalski, A. "Metastable secondary structure in ribosomal RNA molecular hysteresis in acid-base titration of *Escherichia Coli* ribosomal RNA." J. Mol. Biol. 1973, 79, 95-114.

Richards, F. M. "Areas, volumes, packing and protein structure." Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1977, 6, 151-176.

Rose, G. D., Geselowitz, A. R., Lesser, G. J., Lee, R. H. et Zehfus, M. H. "Hydrophobicities of amino acid residues in globular proteins." Science 1985, 229, 834-838.

Rothschild, K. J. et Clark, N. A. "Anomalous Amide I band absorption of purple membrane." Science 1979, 204, 311-312.

Salemme, F. R. "Structural properties of protein β -sheets." Prog. Biophys. Molec. Biol. 1983, 42, 93-133.

Scheraga, H. A. "Influence of interatomic interactions on the structure and the stability of polypeptides and proteins." Biopolymers 1981, 20, 1877-1899.

Schulz, G. E. et Schirmer, R. H. "Principles of protein structure." C.R Cantor (ed.), New York: Springer-Verlag, 1979.

Spolar, R. S., Ha, J.-H. et Record, M. T. "Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1989, 86, 8382-8385.

Spolar, R. S., Livingstone, J. R. et Record, M. T. "Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate the contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surfaces from water." Biochemistry, 1992, 31, 3947-3955.

Surewicz, W. K. et Mantsch, H. H. "New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra." Biochim. Biophys. Acta, 1988, 952, 115-130.

Suzuki, E., Crewther, W. G., Fraser, R. B. D., MacRae, T. P. et McKern, N. M. "X-ray diffraction and infrared studies of an α -helical fragment of α -keratin." J. Mol. Biol. 1973, 73, 275-278.

Tanateka, T., Harada, K. et Matsumoto, M. "Structural studies of poly- γ -benzyl-L-glutamate monolayers by infrared ATR and transmission spectra." J. Colloid Interface Sci. 1980, 73, 569-577.

Thanki, N., Umrana, Y., Thornton, J. M et Goodfellow, J. M. "Analysis of protein main-chain solvation as a function of secondary structure." J. Mol. Biol. 1991, 221, 669-691.

Van Duijnen, P., Th., De Jager, J. C. et Thole, B. T. "Do parallel β -strands have dipole moments? An *ab initio* molecular-orbital-direct reaction field study." Biopolymers 1985, 24, 735-745.

Wada, A. "The α -helix as an electric macrodipole." Adv. Biophys. 1976, 9, 1-63.

Weber, P. C. et Salemme, F. R. "Structural and functional diversity in 4- α -helical proteins." Nature 1980, 287, 82-84.

ANNEXE A

Nous avons discuté au chapitre 1 du fait que l'entassement ou l'interdigitation d'hélices- α peut mener à la formation de super-hélices à deux ou plusieurs brins. Dans ce contexte, nous avons considéré la possibilité que de telles super-hélices puissent être formées en changeant l'état de compression d'un film d'homopolypeptides hydrophobes organisés en hélices- α à l'interface air-eau. Ainsi, nous présentons dans cette annexe les résultats d'une modélisation où nous avons évalué la possibilité que les hélices- α de PLA puissent se retrouver sous forme de super-hélices à deux brins au début de la première transition de phase observée sur son isotherme Π -A vers $12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ (chapitre 4 et Lavigne *et al.* (1992)). En effet, nous avons montré au chapitre 4 que les hélices- α de PLA sont interdigitées à une telle valeur d'aire résiduelle.

Pour une organisation complètement interdigitées de super-hélices à deux brins telle que présentée aux Figures 42 c et d, nous pouvons constater que la distance inter-hélices effective dans le plan de la surface (indiquée par les traits sur la Fig. 42d) est la même que pour une organisation en hélices- α non-tordues (chapitre 3, Fig.12).

Ainsi, sur une base purement géométrique, l'existence de super-hélices à deux brins au début de la première transition ($12,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$) est, jusqu'ici, tout à fait plausible.

Nous pouvons aussi constater à la Fig. 42d que pour une telle organisation, des super-hélices à deux brins ne sont pas dans un état d'entassement optimal.

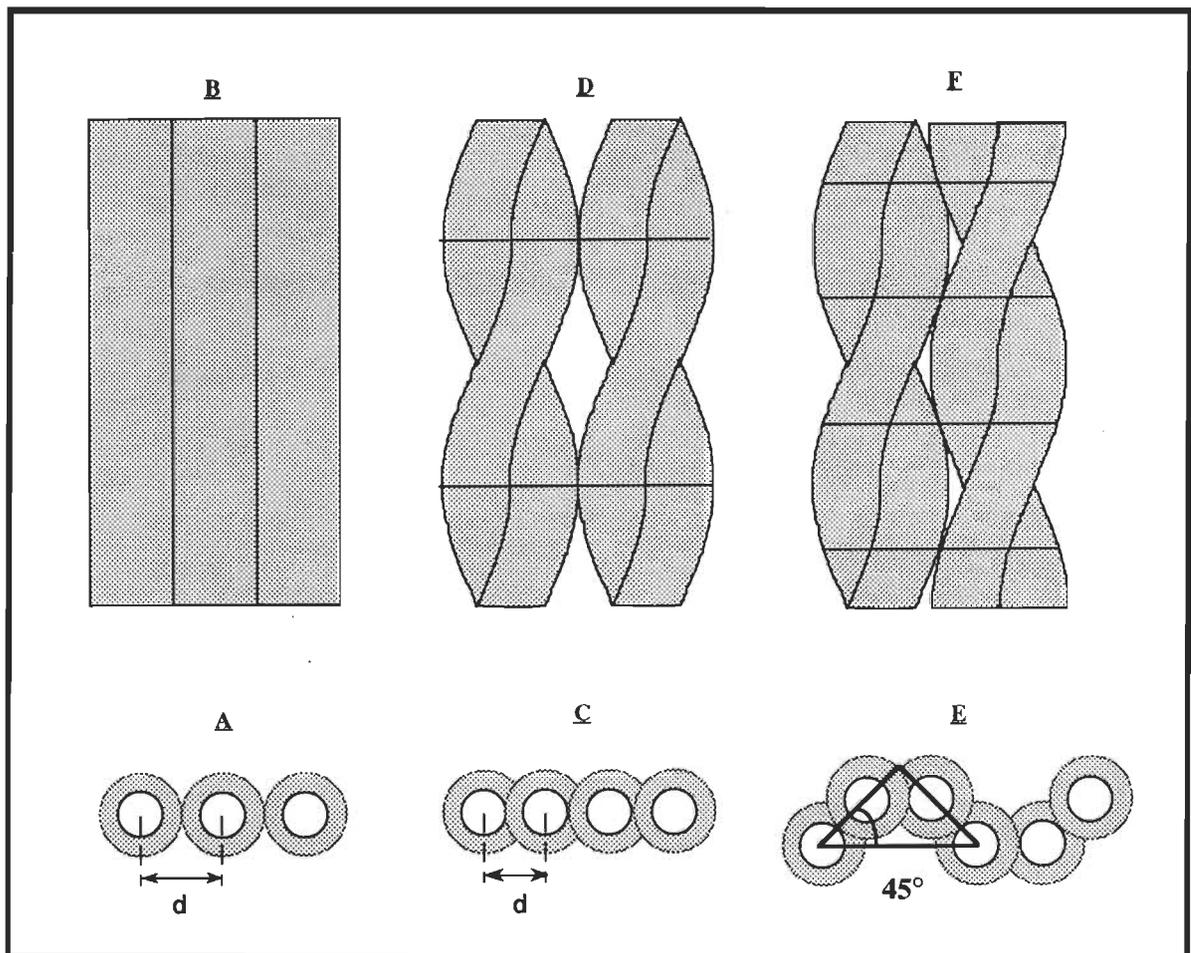


Figure 42. Modèles d'organisations de super-hélices à deux brins à l'interface air-eau.

En effet, nous montrons à la Fig. 42f que les super-hélices peuvent s'entasser davantage dans le plan de la surface en subissant une rotation de 45° (Fig. 42e). Suite à une telle rotation, les contacts (indiqués par les traits sur la Fig. 42f) entre les super-hélices à deux brins se font alternativement dans le plan et hors du plan de la surface (Fig. 42e). Pour cette organisation des super-hélices, la distance inter-hélices moyenne dans le plan de la surface est donnée par la relation A.1:

$$(d (1 + \cos 45^\circ))/2 \quad (\text{A.1})$$

En considérant que la distance entre les hélices dans les super-hélices est la même que celle considérée pour des hélices- α interdigitées *i.e.* $8,5 \text{ \AA}$ (voir chapitre 4), il est possible de calculer à l'aide de la relation A.1 une distance inter-hélices moyenne de $7,25 \text{ \AA}$. En multipliant cette distance inter-hélices moyenne par la translation selon l'axe d'une hélice- α de $1,5 \text{ \AA}/\text{résidu}$, nous pouvons calculer une aire résiduelle moyenne de $10,9 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ pour une organisation des super-hélices à deux brins telle que schématisée à la Fig. 42f. Rigoureusement, la translation des résidus selon l'axe d'une super-hélice est inférieure de 5% à la translation pour une hélice non-tordue. Cependant, pour le présent contexte, cet écart est négligeable. Cette valeur d'aire résiduelle moyenne de $10,9 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$, n'est pas sans rappeler la valeur d'aire résiduelle de $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ observée à la fin de la première transition phase sur l'isotherme Π -A de la PLA (chapitre

4). Ainsi, d'un point de vue strictement géométrique, la première transition de phase observée sur l'isotherme Π -A de la PLA pourrait correspondre à la rotation des super-hélices telle que nous venons de le considérer. Dans ce contexte, la seconde transition de phase débutant vers $10,5 \text{ \AA}^2/\text{résidu}$ sur l'isotherme Π -A de la PLA pourrait correspondre à la formation d'une bicouche de super-hélices.

Cependant, il a été démontré par diffraction des rayons-X, que les hélices- α de PLA à l'intérieur de fibres orientés s'interdigitent sans que cela ne conduise à la formation de super-hélices (Fasman, G. D. (1967)). D'un autre côté, il a déjà été proposé dans la littérature que la formation de super-hélices serait accompagnée d'un déplacement vers des nombres d'ondes plus élevés de la fréquence de la bande Amide I.

Ce déplacement serait attribuable à une augmentation de la longueur de la liaison-H entre les CO et les NH du squelette polypeptidique suite à la légère déformation des hélices- α à l'intérieur des super-hélices (Rothschild et Clark (1979)). Comme la formation de super-hélices devrait survenir à la suite de l'interdigitation des hélices- α , nous avons vérifié la position de la bande Amide I sur les spectres FTIR-MIR de films Langmuir-Blodgett de PLA construits au point de décollement de Π (où une organisation côte à côte des hélices fut proposée, Figures 42a et b) et au début de la première transition (où nous avons montré que les hélices- α de PLA étaient interdigitées). Aucun déplacement de la bande Amide I fut observé.

D'autre part, la position de bande Amide I (1658 cm^{-1}) sur les spectres FTIR-MIR que nous avons enregistrés pour la PLA est légèrement plus élevée que les valeurs normalement rapportées dans la littérature pour les hélices- α des protéines globulaires de même que pour les homopolypeptides hydrophobes et hydrosolubles et qui sont normalement comprises entre 1650 et 1655 cm^{-1} (Rothschild et Clark (1979) et Arrondo *et al.* (1993)). Ainsi, la possibilité que les hélices- α de PLA se retrouvent déjà sous forme de super-hélices au point de décollement de Π doit être prise en considération. Par contre, les spectres IR de fibres orientées de PLA pour lesquelles une interdigitation sans la formation de super-hélices a été mise en évidence, présentent aussi une bande Amide I située vers 1658 cm^{-1} (Itoh *et al.* (1969)). Ainsi, il apparaît que la fréquence légèrement élevée de la bande Amide I sur les spectres IR et FTIR-MIR de la PLA centrée vers 1658 cm^{-1} repose sur un mode de vibration caractéristique de la PLA plutôt que sur une organisation en super-hélices. Dans cet ordre d'idée, les spectres IR de fragments de protéines dont les patrons de diffraction des rayons-X démontrent clairement une organisation en super-hélices présentent une bande Amide I "normale" centrée à 1653 cm^{-1} (Suzuki *et al.* (1973)). À la lumière de ces observations, il semble donc qu'une augmentation de la fréquence de la bande Amide I ne soit pas un bon critère pour mettre en évidence l'organisation de protéines ou de polypeptides en super-hélices.

Ainsi, en l'absence d'évidences expérimentales probantes, nous devons écarter la possibilité que les hélices- α de PLA puissent être organisées en super-hélices à deux brins à l'interface-air eau même si d'un point de vue géométrique leur existence est modélisable.