



**HAL**  
open science

**Propriétés d'auto-assemblage de phospholipides riches  
en acides gras polyinsaturés : caractérisation  
physico-chimique et simulation de bicouches par  
dynamique moléculaire**

Pascale Sautot

► **To cite this version:**

Pascale Sautot. Propriétés d'auto-assemblage de phospholipides riches en acides gras polyinsaturés : caractérisation physico-chimique et simulation de bicouches par dynamique moléculaire. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL032N . tel-01749542

**HAL Id: tel-01749542**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749542>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE  
ÉCOLE DOCTORALE : *RP2E*  
Laboratoire d'Ingénierie de Biomolécules

**THÈSE**

pour l'obtention du grade de Docteur de l'INPL  
Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires  
Présentée par

**Pascale SAUTOT**

---

Propriétés d'auto-assemblage de phospholipides riches en acides gras  
polyinsaturés : caractérisation physico-chimique et simulation de bicouches par  
dynamique moléculaire

---

Soutenue publiquement le 03 Juin 2011 devant la commission d'examen

Rapporteurs :	M. Michel LAGARDE M. Christophe RAMSEYER	Professeur, INSA-INSERM, Lyon Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon
Examineurs :	Mme Marie-José STEBE M. Rachid SOULIMANI M. Michel LINDER M. Mounir TAREK Mme Elmira ARAB-TEHRANY	Professeur, Nancy Université, Nancy Professeur, INRA, Metz Professeur, INPL-ENSAIA, Nancy Directeur de Recherche, CNRS, Nancy Maitre de conférences, INPL-ENSAIA, Nancy



## **Avant-propos**

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et d'Industries Alimentaires sous la direction de Monsieur Michel Linder, Professeur à l'ENSAIA. Je tiens à le remercier pour la grande liberté d'action qu'il m'a accordée au cours de cette thèse et pour ses nombreux conseils.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Mounir Tarek, Directeur de Recherche au CNRS et co-directeur de cette thèse, pour le soutien et la patience qu'il m'a témoignés pour mener à bien ce travail de recherche. Je tiens à le remercier de m'avoir inculqué les principes qui sont à la base de toute démarche scientifique : la curiosité, la rigueur et la ténacité.

Je remercie Monsieur Michel Lagarde, Professeur à l'INSERM-INSA de Lyon et Monsieur Christophe Ramseyer, Professeur à l'Université de Franche-Comté pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier Madame Marie-José Stébé, Professeur à l'Université de Nancy et Monsieur Rachid Soulimani, Professeur à l'INRA de Metz pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Je remercie particulièrement Madame Stébé pour son aide précieuse apportée pour les mesures de diffraction des rayons X et de monocouche sur balance de Langmuir, ainsi que Monsieur Stéphane Désobry, Professeur à l'ENSAIA de Nancy pour son aide lors de l'interprétation des résultats des mesures d'hydratation des phospholipides.

Mes sincères remerciements vont également à Carole Jeandel et Carole Perroud pour leur sympathie et pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée durant cette thèse. Un grand merci également à tous les chercheurs du LIBio pour leur collaboration, de près ou de loin à ce travail, par un conseil ou une lumière apportée.

Cette thèse ayant été réalisée en partenariat avec l'équipe de chimie théorique de Nancy, je souhaite en remercier ses membres de m'avoir si bien accueillie au sein de leur groupe, notamment Lucie Delemotte, « étudiante faisant partie des meubles », sans qui l'apprentissage des techniques de modélisation moléculaire m'aurait laissé un douloureux souvenir. Je

remercie également Madame Elmira Arab-Tehrany, Maître de conférences au LIBio, pour avoir été à l'initiative de la collaboration entre les deux laboratoires.

Je souhaite également remercier Monsieur Ulderico Wanderlingh, Professeur à l'Université de Messine en Italie, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et fait partager sa connaissance de la diffraction des rayons X et de la diffusion des neutrons sur les membranes.

Je tiens à remercier tous les doctorants et post-doctorants que j'ai eu l'occasion de rencontrer au travers de cette thèse pour les bons moments passés en leur compagnie, que ce soit au laboratoire ou en dehors, l'entraide dont ils ont su faire preuve à mon égard et la bonne humeur qu'ils ont apportée, contribuant ainsi à faire de cette thèse une expérience humaine enrichissante. Je pense notamment à Nabila, Leila, Kassem, Mireille, Agnieszka, Behnoush, Majid, Nidal, Smail, Imran et Javeed coté LIBio et Lucie, Eva, Fabien, Adèle et Valeria coté chimie théorique.

Je n'oublie pas les membres de ma famille pour leur soutien constant, on ne se dit jamais assez merci en famille... Un merci tout particulier à Marie-Odile et Bernard Cantus pour m'avoir ouvert leur porte si chaleureusement lors de mes nombreux retours sur Nancy.

Enfin mon dernier merci revient à Stéphane, point de départ de cette thèse. Merci d'avoir été là et d'avoir cru en moi.

## Liste des communications

➤ Communication écrite :

« Structural, hydration and phase transition properties of phosphatidylcholine from salmon heads », Sautot P., M. Tarek, M.-J. Stébé, C. Paris, E. Arab-Tehrany and M. Linder. 2011. Structural, hydration and phase transition properties of phosphatidylcholine from salmon heads. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 744–755.

« From Krill to Whale: an overview of marine fatty acids and lipid composition » Linder, M., N. Belhaj, P. Sautot, E. Arab-Tehrany, *OCL*, 17, 194-204.

« Structural and dynamic properties of a multi-component system enriched in long chain polyunsaturated fatty acids from molecular dynamics simulation » *en cours d'écriture*

➤ Communication orale :

« Extraction, purification and characterization of a marine phosphatidylcholine in presence of water », Pascale Sautot, Mounir Tarek, Elmira Arab-Tehrany, Michel Linder ; 6<sup>ème</sup> Congrès de Lipidomique (Gerli), juillet 2009, Rennes.

➤ Poster :

« Extraction, purification and characterization of a marine phosphatidylcholine », Pascale Sautot, Michel Linder ; 5<sup>ème</sup> Congrès de Lipidomique (Gerli), octobre 2008, Compiègne.

# Sommaire

## SOMMAIRE

Avant-propos .....	1
SOMMAIRE .....	2
Liste des figures .....	8
Liste des tableaux .....	15
Liste des abréviations .....	17
INTRODUCTION GENERALE.....	20
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	24
Partie 1 : Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne.....	24
I. La classe des lipides neutres .....	24
2. Les acides gras .....	24
3. Les acylglycérols.....	25
II. Définition et structure des acides gras polyinsaturés à longue chaîne.....	25
1. Nomenclature .....	25
2. Terminologie .....	26
3. Voies de synthèse .....	27
III. Principales sources d'AGPI .....	27
1. Sources végétales .....	27
2. Sources animales .....	28
IV. Intérêts physiologiques des AGPI-LC .....	29
1. Effets des oméga 3 sur la santé .....	30
2. Effet des AGPI oméga 6 sur la santé.....	31
3. Recommandations pour les AGPI-LC.....	32
V. Le DHA, propriétés d'un acide gras unique .....	33
1. Localisation .....	33
2. Implication sur la santé .....	33

# Sommaire

3.	Influence du DHA sur les protéines membranaires .....	36
VI.	Le risque d'oxydation .....	37
1.	Potentiel d'oxydation des lipides .....	39
Partie 2 : Les phospholipides, structure et propriétés.....		41
I.	Structure et classification.....	41
1.	Structure .....	41
2.	Classification.....	43
3.	Les dérivés de phospholipides.....	46
II.	Rôles des phospholipides.....	47
1.	Constituants majeurs des membranes cellulaires.....	47
2.	Utilisation des phospholipides en industrie alimentaire.....	47
3.	Vecteurs de composés actifs .....	48
III.	Organisation des phospholipides .....	48
1.	Hydratation des phospholipides .....	48
2.	Polymorphisme des phospholipides .....	49
3.	Diagramme de phase de phospholipides .....	52
4.	Thermodynamique du polymorphisme .....	53
5.	Auto-assemblage des phospholipides.....	54
IV.	Systèmes modèles de bicouches phospholipidiques.....	54
1.	Les liposomes.....	54
2.	Monocouches à l'interface air-eau .....	55
3.	Autres systèmes modèles .....	56
Partie 3 : Influence des AGPI sur les propriétés physiques des membranes.....		58
I.	Propriétés structurales.....	58
II.	Propriétés dynamiques des membranes polyinsaturées .....	61
1.	Paramètre d'ordre des chaînes acyles.....	61
2.	Flexibilité .....	61

# Sommaire

3.	Elasticité et compressibilité.....	63
III.	Fluidité de la membrane.....	64
1.	Transition de phase.....	64
2.	Mouvement des lipides.....	65
IV.	Formation de domaines au sein de la membrane.....	66
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES .....		68
Partie 1 : Méthodes expérimentales utilisées .....		68
I.	Méthodes d'extraction et de purification.....	68
II.	Structure de la bicouche par diffraction des rayons X.....	72
1.	Bases théoriques.....	72
2.	Aspects expérimentaux .....	74
III.	Etude des phospholipides en monocouche .....	74
1.	Principe.....	74
2.	Instrumentation.....	76
3.	Expérimentation .....	76
IV.	Caractéristiques du processus d'hydratation.....	77
1.	Intérêt et applications .....	77
2.	Méthodes expérimentales.....	77
Partie 2 : Protocoles expérimentaux.....		78
I.	Extraction et purification de la phosphatidylcholine.....	78
1.	Extraction des lipides par la méthode de Folch et <i>al.</i> (1957).....	78
2.	Fractionnement préliminaire des lipides par chromatographie sur colonne .....	78
3.	Purification de la fraction phosphatidylcholine .....	79
II.	Caractérisation de la composition des lipides.....	80
1.	Séparation des différentes classes de lipides.....	80
2.	Détermination de la composition en acides gras.....	83
3.	Détermination des espèces moléculaires.....	83

# Sommaire

III.	Etude structurale de la phosphatidylcholine .....	85
1.	Préparation des systèmes PC-eau .....	86
2.	Examen au microscope optique.....	86
3.	Etude structurale aux rayons X .....	86
4.	Analyse thermique différentielle.....	87
5.	Etude en monocouche .....	87
IV.	Hydratation de la phosphatidylcholine .....	88
1.	Protocole expérimental.....	88
2.	Modélisation mathématique des données expérimentales .....	88
Partie 3 : Simulation en dynamique moléculaire .....		90
I.	Introduction .....	90
II.	Principe .....	90
1.	Limitations de la dynamique moléculaire .....	91
III.	Champs de force .....	92
1.	Les interactions liées .....	93
2.	Les interactions non liées .....	97
3.	Choix de l'ensemble thermodynamique.....	101
4.	Modélisations des bords du système .....	101
IV.	Données expérimentales nécessaires .....	102
1.	Méthodes de diffraction .....	103
2.	RMN.....	103
3.	Autres méthodes.....	103
V.	Conditions expérimentales des simulations.....	104
1.	Construction du système « PC saumon ».....	104
2.	Construction des systèmes purs.....	107
3.	Etude de monocouche .....	107
4.	Minimisation de l'énergie du système .....	109

# Sommaire

5. Equilibration des systèmes .....	109
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....	111
Partie 1 : Extraction, purification et caractérisation de la composition de la phosphatidylcholine issue du saumon .....	111
I. Purification de la phosphatidylcholine .....	111
1. Séparation des phospholipides par HPLC .....	111
2. Séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince .....	112
3. Séparation par chromatographie sur colonne .....	113
II. Analyse de la composition .....	114
1. Composition des lipides totaux issus des têtes de saumon.....	114
2. Composition en acides gras des différentes fractions .....	115
3. Détermination des espèces moléculaires.....	120
Partie 2 : Propriétés physiques de la phosphatidylcholine extraite du saumon.....	125
I. Equilibre de phase .....	125
1. Microscopie optique .....	125
2. Diffraction des rayons X .....	126
3. Analyse thermique différentielle.....	127
4. Diagramme de phase binaire PC-eau .....	132
II. Etude structurale des multicouches.....	133
1. Evolution de la lamellarité en fonction de l'hydratation.....	133
2. Surface disponible par tête polaire .....	134
3. Paramètres structuraux de la PC en multicouches .....	136
III. Etude de l'hydratation de la phosphatidylcholine.....	140
1. Courbes isothermes d'adsorption de vapeur d'eau .....	140
2. Modélisation mathématique des isothermes .....	141
3. Cinétique d'hydratation.....	143
IV. Etude des monocouches à l'interface air/eau.....	149

# Sommaire

V. Discussion .....	151
Partie 3 : Simulation in silico de bicouches de phosphatidylcholine de saumon .....	154
I. Comparaison aux résultats expérimentaux .....	154
1. Evolution de la distance de répétition des bicouches .....	154
2. Evolution de l'aire par lipide.....	155
3. Détermination des profils de densité.....	158
II. Etude de la conformation des chaînes acyles.....	162
1. Détermination des paramètres d'ordre .....	162
2. Etude de la répartition des dièdres dans les chaînes hydrocarbonées .....	165
3. Hydratation des têtes polaires .....	169
III. Influence de l'hydratation sur les propriétés structurales des multicouches de phosphatidylcholine de saumon .....	171
1. Objectifs de l'étude .....	171
2. Modification de l'aire par lipide.....	172
3. Modification de la structure des bicouches .....	174
4. Effet sur l'organisation des chaînes carbonées .....	176
5. Hydratation des têtes polaires .....	178
IV. Etude de la phosphatidylcholine de saumon à 263K, vers un état de gel ? .....	180
V. Etude de la phosphatidylcholine en monocouche.....	184
1. Choix du modèle de l'eau.....	185
2. Comparaison des isothermes de compression.....	185
VI. Discussion.....	188
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	191
Références .....	195

## Liste des communications

Communication écrite : « Structural, hydration and phase transition properties of phosphatidylcholine from salmon heads », Pascale Sautot, Mounir Tarek, Marie-José Stébé, Cédric Paris, Elmira Arab-Tehrany, Michel Linder ; publication acceptée dans *European Journal of Lipid Science and Technology*, mars 2011.

Communication orale : « Extraction, purification and characterization of a marine phosphatidylcholine in presence of water », Pascale Sautot, Mounir Tarek, Elmira Arab-Tehrany, Michel Linder ; 6<sup>ème</sup> Congrès de Lipidomique (Gerli), juillet 2009, Rennes.

Poster : « Extraction, purification and characterization of a marine phosphatidylcholine », Pascale Sautot, Michel Linder ; 5<sup>ème</sup> Congrès de Lipidomique (Gerli), octobre 2008, Compiègne.

## Liste des figures

Figure I.1. Différence de nomenclature et de configuration des doubles liaisons pour les acides gras insaturés

Figure I.2. Voies de synthèses des AGPI-LC à partir des acides gras indispensables.

Figure I.3. Mécanisme d'auto-oxydation des lipides polyinsaturés d'après [1].

Figure I.4. Structure des phospholipides. Les cercles représentent les différents squelettes, glycérol (à gauche) et sphingosyl (à droite) ; *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3 représentent la numérotation stéréo-spécifique au niveau du glycérol, d'après [2].

Figure I.5. Résidus rattachés à l'acide phosphatidique de la tête polaire [3]

Figure I.6. Structure d'un plasmalogène. Le cercle représente la liaison vinyl-éther en position *sn*-1 du glycérol, d'après [2].

Figure I.7. Représentation schématique des différentes organisations supramoléculaires adoptées par des phospholipides plongés en milieu aqueux

Figure I.8. Représentation schématique des principales phases formées par un mélange eau-phospholipides : (a) phase gel lamellaire, (b) phase lamellaire liquide cristal, (c) et (d) phases hexagonales. Adaptée de la référence [3].

Figure I.9. Schéma des différentes phases lamellaires trouvées pour la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine en fonction de la température:  $L_{\beta}$ , phase gel,  $P_{\beta}$ , phase gel ridé,  $L_{\alpha}$ , phase liquide cristal. Le sens des flèches indique une augmentation de température. Adaptée de la référence [3].

Figure I.10. Diagramme de phase de la DPPC dans l'eau. Sont indiquées la phase lamellaire gel ( $L_{\beta}$ ), la phase lamellaire fluide ( $L_{\alpha}$ ) et la phase gel ridé intermédiaire ( $P_{\beta}$ ). A haute température et faible hydratation, d'autres phases peuvent se former (la phase cubique  $Q_{\alpha}$  et la phase hexagonale  $H_{\alpha}$ ). La ligne en pointillés indique le maximum d'eau qui peut être absorbée avant un déphasage. Adapté de la référence [3].

Figure I.11. (A) Représentation schématique des chaînes acyles polyinsaturée (gauche) et saturée (droite) partiellement désordonnée au sein d'une membrane. (B) Volume occupé par les chaînes DHA et stéaroyl, représenté par des cylindres de section  $A_{ch}$  et de longueur  $L$ . Repris de la réf. [4].

Figure I.12. Représentation des conformations de plus basse énergie pour la molécule DHA déterminées par Applegate et Glomset [5] dans lesquelles les doubles liaisons sont projetées vers l'extérieur de l'axe méthylène dans deux plans quasi perpendiculaires.

Figure I.13. Surface d'énergie de rotation autour de la liaison simple entre les unités voisines des méthylènes (trait plein) et butane (trait haché) décrit par [6].

## Listes des figures

Figure I.14. Dépendance de  $T_m$  en fonction du nombre de doubles liaisons *cis* par chaîne dans des bicouches PC saturées en eau (A) homo-acides à 18 atomes de carbones; (B) hétéro-acides composés d'une chaîne 18:0 en *sn-1* et contenant jusqu'à 6 doubles liaisons en *sn-2*. Les valeurs ont été reprises d'après [7].

Figure II.1. Représentation schématique du principe général de diffusion ;  $\vec{k}_i$  représente le rayon incident,  $\vec{k}_f$  le rayon diffusé et  $\vec{k}_t$  le rayon transmis, d'après [8].

Figure II.2. (Haut) Représentation schématique d'une isotherme de compression  $\pi$ -A. (Bas) Orientation des molécules amphiphiles lors des différentes phases.

Figure II.3 : Illustration schématique d'une balance de Langmuir avec une lame de Wilhelmy mesurant la pression de surface.

Figure II.4. Schéma du principe de fonctionnement du Iatroscan ®

Figure II.5. Energie liée à l'élongation des liaisons. (A) 2 particules *i* et *j* sont liées par une liaison covalente de longueur  $r_{ij}$  équivalant à un ressort. (B) Profil de l'énergie  $E^{\text{bond}}$  en fonction de la longueur instantanée de la liaison entre les particules *i* et *j* ( $r_{ij}$ ) où  $r_0$  est la longueur de la liaison à l'équilibre.

Figure II.1. Energie liée à la déformation des angles et des angles impropres. (A) 3 particules *i*, *j* et *k* forment un angle  $\theta$  flexible ( $\theta_0$  à l'équilibre). (B) Profil de l'énergie  $E^{\text{angle}}$  en fonction de la déformation de l'angle formé par *i*, *j* et *k*.

Figure II.7. Energie liée à la torsion des liaisons et à la déformation des angles impropres. (A) 4 particules *i*, *j*, *k* et *l* forment un angle dièdre  $\tau$ . (B) Profil d'énergie en fonction de  $\tau$ . (C) 4 particules *i*, *j*, *k* et *l* forment un angle  $\theta$  flexible, *l* est alors plus ou moins en dehors du plan (*i*, *j*, *k*). (D) Profil d'énergie  $E^{\text{impropre}}$  en fonction de la déformation de l'angle formé par *i*, *j*, *k* et *l*.

Figure II.8. Energie liée à l'interaction de Lennard-Jones. (A) 2 particules *i* et *j* sont distantes d'un rayon  $r_{ij}$ . (B) Profil d'énergie de l'interaction de Lennard-Jones en fonction de  $r_{ij}$ . Où  $R^*i$  est le rayon de van der Waals de l'atome et  $\epsilon_i$  l'énergie de Lennard-Jones à la distance  $R^*i$ .

Figure II.9. Energie liée à l'interaction électrostatique. (A) 2 particules *i* et *j*, de charges respectives  $q_i$  et  $q_j$ , sont distantes d'un rayon  $r_{ij}$  dans un milieu de permittivité électrostatique  $\epsilon_r$ . (B) Profil d'énergie de l'interaction électrostatique en fonction de  $r_{ij}$  pour  $q_i$  et  $q_j$  de signe opposé (e.g.  $q_i > 0$  et  $q_j < 0$ ). Il est à noter que si  $q_i$  et  $q_j$  sont de même signe, on obtient la courbe opposée (symétrique par rapport à l'axe  $r_{ij}$ ).

Figure II.10. Représentation bidimensionnelle des conditions périodiques utilisées en dynamique moléculaire. La boîte de simulation principale est représentée par un rectangle en trait épais. Les boîtes et les particules-images sont représentées autour en gris. La particule *i*, en noir, interagit avec ses voisines incluses dans un rayon représenté par la surface grise. Cette dernière n'est donc pas censée interagir avec l'une de ses images. La particule *j*, en rouge, subit les conditions périodiques aux limites du système. Lorsque qu'elle sortira de la boîte de simulation par la droite, son image rentrera par la gauche (adapté de [9]).

## Listes des figures

Figure II.11. Structure moléculaires des phospholipides POPC, PDPC, PPPC, PEPC et PeDPC rentrant dans la composition du mélange PC saumon.

Figure II.12. Positionnement des différents lipides sur une monocouche de 64 lipides.

Figure II.13. Photo instantanée d'une bicouche de PC saumon équilibrée et solvatée à 37 molécules d'eau par lipide. Les chaînes lipidiques sont représentées en bleu et les molécules d'eau entourant la membrane en rouge et blanc. A titre indicatif, un résidu PDPC est agrandi : la chaîne DHA est représentée en orange et la chaîne palmitique en vert.

Figure II.14. Photo instantanée d'une monocouche de PC saumon à l'interface air/eau lorsque l'aire par lipide vaut 70 Å<sup>2</sup>/lipide. Les atomes de phosphore (ocre) et d'azote (bleu) sont grossis de manière à faire ressortir l'emplacement des têtes polaires.

Figure III.1 Chromatogrammes des différents standards de phospholipides selon la procédure HPLC semi-préparative. Par souci de clarté, les profils ont été décalés sur l'axe des y. A titre d'exemple, un échantillon de PC purifiée à partir de LT de saumon est également représenté.

Figure III.2. Elution des standards de phospholipides par CCM dans un bain de chloroforme/méthanol/ammoniaque (65/35/5 v/v) sur une plaque analytique.

Figure III.3. Profil Iatroskan de la fraction PC purifiée par chromatographie sur colonne après élution dans un bain de chloroforme/méthanol/ammoniaque (65/35/5 v/v). n.i. correspond à la fraction non identifiée.

Figure III.4. Procédure de fragmentation MS<sup>2</sup> qui conduit à la perte du contre-ion formiate et d'un groupement méthyle et permet l'identification de l'espèce PC.

Figure III.5. Spectres MS, MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup> de l'adduit PC *m/z* 804,5 et détermination de l'espèce moléculaire correspondante par LC-MS.

Figure 2. Observations au microscope polarisant des systèmes PC saumon – eau à 10, 50 et 60% d'eau et à 22°C. Les cercles entourent les motifs caractéristiques observés en phase lamellaire (x 40)

Figure III.7. Spectres de pics de Bragg obtenus par diffraction des rayons X aux petits angles sur l'échantillon de PC saumon en fonction du degré d'hydratation. Mesures réalisées à 25°C. L'échantillon correspond à des multicouches non orientées.

Figure III.8. Diagramme de phase du système PC saumon – eau déterminé à partir des résultats expérimentaux. Légende : L<sub>α</sub>, phase lamellaire liquide cristal ; L<sub>β</sub>, phase lamellaire gel ; T<sub>m</sub>, température de transition de phase. La zone hachurée correspond à la limite théorique séparant la phase gel d'une dispersion colloïdale en phase gel et l'eau.

## Listes des figures

Figure III.9. Distances de répétition pour des multicouches de PC mesurées par diffraction des rayons X pour la PC de saumon, PC de soja et PC d'œuf, en fonction du taux d'hydratation. Les résultats pour la PC d'œuf et de soja proviennent des références [10] et [11] respectivement.

Figure III.10. (A) Aire par lipide calculée à partir des distances de répétitions en fonction du taux d'hydratation pour la PC de saumon, œuf et soja. (B) Distance hydrophobe déterminée à partir de l'aire par lipide en fonction du taux d'hydratation pour la PC de saumon, œuf et soja.

Figure III.11. Représentation schématique montrant l'organisation de deux phospholipides assemblés dans une bicouche illustrant les différents paramètres structuraux :  $d$  est la distance de Bragg,  $d_w$  la distance hydrophile,  $d_{wf}$  la couche d'eau libre,  $d_{HC}$  la distance hydrophobe,  $V_{HC}$  le volume hydrophobe,  $V_{PH}$  le volume de la tête polaire et  $V_{PC}$  le volume molaire.

Figure III.12. Isothermes d'adsorption de vapeur d'eau pour la PC de saumon, œuf et soja en molécules d'eau adsorbée par lipide en fonction de l'humidité relative (H.R.) environnante. Chaque isotherme correspond à une moyenne de trois essais. Par souci de clarté, les écart-types ne sont pas représentés.

Figure III.13. Quantité de vapeur d'eau adsorbée par la matière sèche (M.S.) en fonction du temps en mg eau/mg de PC anhydre pour la PC de saumon, œuf et soja. Les mesures ont été réalisées à 25°C et correspondent à un profil standard pour chaque échantillon. Insert en haut à gauche : Temps nécessaires pour atteindre l'équilibre à chaque palier d'hydratation ramené en minutes/mg de PC pour la PC de saumon, œuf et soja. Les résultats correspondent à une moyenne de trois essais et sont présentés avec les écart-types.

Figure III.14. Représentation schématique de la détermination des vitesses initiales à 0, 25, 50 et 95% d'hydratation au sein d'une même étape.

Figure III.15. Vitesses initiales d'hydratation en fonction de la progression d'hydratation dans un même palier (à 0, 25, 50 et 95% d'hydratation) pour la PC de saumon. Les résultats sont présentés comme une moyenne de trois essais avec les écart-types. Chaque couleur correspond à une étape d'hydratation.

Figure III.16. Isothermes de pression de surface en fonction de l'aire par lipide pour la PC de saumon, d'œuf et de soja à l'interface air/eau.

Figure III.17. Comparaison des résultats expérimentaux et de simulation pour la distance de répétition de la PC saumon en fonction du taux d'hydratation. Les résultats de simulation sont présentés avec les écarts-types pour une analyse réalisée sur les dernières 6 ns.

Figure III.18. Comparaison des résultats expérimentaux et de simulation pour l'aire par lipide de la PC saumon en fonction du taux d'hydratation. Les résultats de simulation sont présentés avec les écarts-types pour une analyse réalisée sur les dernières 6 ns. Pour le système expérimental à 4,6 molécules d'eau par lipide, la détermination de l'aire par lipide n'a pas été effectuée puisque les spectres de rayons X ont montré que le système n'était pas en multicouche.

## Listes des figures

Figure III.19. Profil de densité pour les systèmes de PC saumon, POPC et PDPC en fonction de la localisation au niveau de la normale de la bicouche, le 0 de l'axe  $z$  étant centré par rapport au centre de la membrane. Profils présentés pour les différents groupes constitutifs de la bicouche : l'eau (trait plein), le groupement choline qui, par souci de clarté, a été multiplié par 2 (tirets), le groupement phosphate (tiret – point – point), le groupement glycérol (pointillés), les chaînes acyles (tiret – point) et les doubles liaisons dans les chaînes acyles (en gris). Chaque profil est montré à 298K et à pour un état saturé en eau.

Figure III.20. Profils de densité correspondant aux premiers et derniers atomes de carbone des chaînes acyles des systèmes PC saumon, POPC et PDPC à 298K.

Figure III.21. Résultats expérimentaux et de simulation des paramètres d'ordre pour (A) les chaînes palmitoyl en  $sn-1$  pour les systèmes, PC saumon, POPC et PDPC ; (B) les chaînes oleyl en  $sn-2$  pour les systèmes POPC et PC saumon ; (C) les chaînes docosahexaenoyl pour les systèmes PDPC et PC saumon. Les résultats expérimentaux sont représentés par des symboles individuels : cercles vides pour la chaîne  $sn-1$  PDPC [12], carrés vides pour la chaîne  $sn-1$  POPC [13], carrés pleins [14] et triangles pleins [15] pour la chaîne  $sn-2$  POPC, cercles pleins pour la chaîne  $sn-2$  PDPC [12].

Figure III.22. Probabilité de distribution des angles de torsion pour les chaînes  $sn-1$  acide palmitique,  $sn-2$  acide oléique et DHA du système PC saumon. Résultats pour le système simulé à 298K et à 37 molécules d'eau par lipide. Les probabilités commencent pour les dièdres impliquant la liaison  $C_2-C_3$  à chaque cas.

Figure III.23. Fonctions de distribution radiale correspondant aux molécules d'eau entourant (A) l'azote, (B) le phosphate et (C) l'oxygène des têtes polaires pour les systèmes PC saumon, POPC et PDPC à 298K.

Figure III.24. Evolution des dimensions d'une cellule de simulation du système PC saumon hydraté à 10 molécules d'eau par lipide. La flèche correspond au temps de simulation à partir duquel on considère que le système est stable au niveau de l'évolution de la distance de répétition.

Figure III.25. Profil de densité du système PC saumon hydraté à 6, 10 et 28 molécules d'eau par lipides à 298K. Voir légende de la Fig. 19 pour le détail des groupements présentés. Par souci de clarté, les profils du groupement choline ont été multipliés par 2. Les profils représentés en brun à 6 et 10 molécules d'eau par lipide correspondent aux images des bicouches obtenues grâce aux conditions périodiques aux limites pour les groupements choline et phosphate.

Figure III.26. Paramètres d'ordre pour les systèmes PC saumon à 298K et à différentes teneurs en eau : 6 (noir), 10 (rouge), 18 (vert), 28 (bleu) et 37 (cyan) molécules d'eau par lipide. Les niveaux supérieurs correspondent aux chaînes palmitiques (PALM) en  $sn-1$  et les graphes du dessous aux chaînes oléiques (OLEI), DHA et EPA en  $sn-2$ .

Figure III.27. Fonctions de distribution radiale correspondant aux molécules d'eau entourant (A) l'azote, (B) le phosphate et (C) l'oxygène des têtes polaires pour les systèmes PC saumon hydratés à 6, 10, 18, 28 et 37 molécules d'eau par lipide.

## Listes des figures

Figure III.28. Paramètres d'ordre pour les systèmes PC saumon à 263K et à différents teneurs en eau : 10 (rouge), 18 (vert), 28 (bleu) et 37 (cyan) molécules d'eau par lipide. Les niveaux supérieurs correspondent aux chaînes palmitiques (PALM) en *sn*-1 et les graphes du dessous aux chaînes oléiques (OLEI), DHA et EPA en *sn*-2.

Figure III.29. Photo instantanée d'une monocouche de PC saumon simulée à l'interface air/eau et dont l'aire par lipide est de 45 Å<sup>2</sup>/lipide.

Figure III.30. Comparaison entre les isothermes de pression-surface moléculaire obtenus par simulation (symboles remplis) et par mesures expérimentales (symboles vides) pour la PC de saumon (cercles) et DPPC (carrés). Pour DPPC, les résultats en simulation ont été repris de [16] et les résultats expérimentaux de [17]. La température des systèmes est de 298K pour la PC de saumon et 323K pour DPPC.

## Liste des tableaux

Tableau I.1. Composition en lipides des principales sources végétales d'AGPI classées selon leur teneur en AGPI.

Tableau I.2. Composition en lipides et acides gras de diverses sources marines. Les teneurs en lipides totaux (LT) sont donnés en % de matières sèches et les teneurs en acides gras en % relatifs.

Tableau I.3. Composition des acides gras majoritaires issus des phospholipides de muscle comestible de cabillaud (*Gadus morhua*) et saumon d'Atlantique (*Salmo salar*), comparé à ceux de corps éviscérés de capelan (*Mallotus villosus*) ceux de muscle adducteur de coquille Saint-Jacques (*Placopecten magellanicus*).

Tableau I.4. Récapitulatif des différentes mésophases [18].

Tableau I.5. Comparaison des valeurs de la littérature pour différents paramètres structuraux de la PC d'œuf en bicouches fluides.

Tableau II.1. Récapitulatif de quelques méthodes d'extraction et de purification des lipides, de l'extraction des lipides totaux à la récupération des différentes classes de phospholipides.

Tableau II.2. Composition moléculaire du système PC saumon contenant 128 lipides.

Tableau III.1. Teneur en lipides totaux et polaires dans les têtes de saumon (% relatif par rapport à la fraction LP uniquement).

Tableau III.2. Comparaison du profil des acides gras des différentes fractions extraites des têtes de saumon. Les données correspondent au pourcentage relatif d'acides gras totaux sur une moyenne de 5 échantillons avec leurs écart-type.

Tableau III.3. Comparaison de la teneur en lipides totaux et de leur composition en acides gras pour différentes parties du saumon d'Atlantique (*Salmo salar*). Les résultats pour la composition en acides gras sont donnés en % relatif, ceux pour la teneur en lipide en % massique.

Tableau III.4. Comparaison de composition en acides gras de plusieurs sources naturelles de phosphatidylcholine et impact sur leur ratio n-3/n-6.

Tableau III.5. Composition moléculaire de la PC de saumon.

Tableau III.6. Composition moléculaire de la PC d'œuf.

Tableau III.7. Composition moléculaire de la PC de soja.

Tableau III.8. Influence de la teneur en eau sur la température de transition de phase et l'enthalpie associé pour différentes multicouches de PC.

## Liste des tableaux

Tableau III.9. Paramètres structuraux pour la PC de saumon et d'œuf.

Tableau III.10. Paramètres obtenus après modélisation des isothermes de sorption pour la PC de saumon, d'œuf et de soja en utilisant les modèles BET, GAB et TSS. Les résultats correspondent à une moyenne sur 3 essais présentés avec leurs écarts-types.

Tableau III.11. Vitesses initiales d'hydratation à différent taux dans un même palier pour la PC de saumon, d'œuf et de soja.

Tableau III.12. Récapitulatif des résultats de simulation des bicouches lipidiques pour les différents systèmes à 298K.

Tableau III.13. Pourcentage moyen de conformations gauche<sup>+</sup>, skew<sup>+</sup>, trans, skew<sup>-</sup>, gauche<sup>-</sup> dans les chaînes palmitique, oléique et DHA des systèmes PC saumon, POPC et PDPC et 298K.

Tableau III.14. Récapitulatif des différents résultats de simulation pour le système PC saumon à différents taux d'hydratation et à 298K.

Tableau III.15. Pourcentage moyen de conformations gauche<sup>+</sup>, skew<sup>+</sup>, trans, skew<sup>-</sup>, gauche<sup>-</sup> dans les chaînes palmitique, oléique et DHA des systèmes PC saumon à 6, 10, 28 et 37 molécules d'eau par lipide et 298K.

Tableau III.16. Récapitulatif des différents résultats de simulation pour le système PC saumon à différents taux d'hydratation et à 263K.

Tableau III.17. Pourcentage moyen de conformations gauche<sup>+</sup>, skew<sup>+</sup>, trans, skew<sup>-</sup>, gauche<sup>-</sup> dans les chaînes palmitique, oléique et DHA des systèmes PC saumon à 10, 28 et 37 molécules d'eau par lipide et 263K.

## Liste des abréviations

A	aire par lipide
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AGS	acides gras saturés
AGMI	acides gras monoinsaturés
AGPI	acides gras polyinsaturés
AGPI-LC	acides gras polyinsaturés à longue chaîne
AL	acide linoléique
ALA	acide $\alpha$ -linoléique
ARA	acide arachidonique
BET	modèle mathématique de Brunauer–Emmett–Teller
CCM – DIF	chromatographie sur couche mince par détection à ionisation de flamme
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
COX-2	cyclooxygénase
D	coefficient de diffusion (de l'eau dans la membrane)
<i>d</i>	distance de répétition ou distance de Bragg
DHA	acide docosahexaénoïque
$d_{HC}$	épaisseur hydrophobe de la membrane
DLPC	1,2-dilaureoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DM	dynamique moléculaire
DMPC	1,2-dimiristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPH	1,6 -diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DVS	Dynamic Vapor Sorption
$d_w$	épaisseur hydrophile
$d_{wf}$	épaisseur de l'eau libre
E	énergie totale du système
EPA	acide eïcospentaénoïque
GAB	modèle mathématique de Guggenheim–Andersen–de Boer
GL	glycolipides

## Liste des abréviations

GUV	Giant Unilamellar Vesicle
HDL	high density lipoprotein
H <sub>I</sub>	phase hexagonale normale
H <sub>II</sub>	phase hexagonale inverse
HR	humidité relative
<i>l</i>	hauteur totale de la boîte de simulation
LC	phase liquide condensée
LC-MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LE	phase liquide étendue
LDL	low density lipoprotein
LN	lipides neutres
LP	lipides polaires
L-PC	lysophosphatidylcholine
LT	lipides totaux
LUV	Large Unilamellar Vesicle
L <sub>c</sub>	phase lamellaire cristalline
L <sub>α</sub>	phase lamellaire cristal-liquide
L <sub>β</sub>	phase lamellaire gel droit
L <sub>β'</sub>	phase lamellaire gel incliné
M	masse moléculaire
MLV	vésicules multilamellaires
N	nombre d'atomes
<i>N</i>	nombre d'Avogadro
P	pression
PBC	conditions périodiques aux limites (Periodic Boundary Conditions)
PC	phosphatidylcholine
PDPC	1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PeDPC	1-pentadecanoyl-2-docosahexaenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PEPC	1-palmitoyl-2-eicosapentaenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PG	phosphatidylglycérol
PI	phosphatidylinositol
PL	phospholipide
PME	Particle Mesh Ewald

## Liste des abréviations

PPPC	1-palmitoyl-2-palmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PR	polyarthrite rhumatoïde
PS	phosphatidylsérine
$P_{\beta}$	phase gel ridé
Q	phase cubique
SAXS	small angles X-ray scattering
SDPC	1-stearoyl-2-docosahexaenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
SM	sphingomyéline
SUV	small unilamellar vesicule
T	température
$T_m$	température de transition de phase gel – cristal-liquide
TSS	modèle mathématique Third Stage Sorption
V	volume
$V_{HC}$	volume hydrophobe
$V_{PC}$	volume molaire de la PC
$V_{PH}$	volume de la tête polaire
$V_T$	volume d'un lipide entouré de son eau
$V_W$	volume d'eau entourant chaque lipide
$\alpha$	teneur en eau en molécules d'eau/lipide
$\alpha_f$	nombre de molécules d'eau par lipide dans la zone d'eau libre
$\alpha_{PH}$	hydratation au niveau de la tête polaire en molécules d'eau/lipide
$\gamma$	tension de surface
$\gamma_m$	tension de surface à l'interface air/monocouche
$\gamma_w$	tension de surface à l'interface air/eau
$\pi$	pression de surface
$\phi_{PC}$	fraction volumique de PC
$\rho$	densité

# INTRODUCTION GENERALE

La production et le commerce halieutiques ont considérablement augmenté ces dernières décennies, à la faveur d'amélioration des technologies, des transports, des communications et d'une demande soutenue. Une large part de la production halieutique est commercialisée dans les réseaux internationaux. Le marché du saumon est en pleine expansion depuis ces trente dernières années avec une production excédant le million de tonnes selon la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture). Parmi les différentes espèces de saumon, le saumon d'Atlantique constitue plus de 90% du marché du saumon d'élevage et plus de 50% du marché total.

Dans le cas de la filière des produits de la mer et de l'aquaculture, les coproduits sont principalement composés de viscères, têtes, arêtes et peaux. Ils sont traités dans les mêmes conditions que la partie comestible. La qualification de coproduit est due au fait qu'ils peuvent représenter une valeur ajoutée pour celui qui les génère. A partir d'un coproduit donné (viscères, têtes, peaux par exemple), il est possible d'obtenir différents produits commerciaux qualifiés de produits dérivés et non de produits finis. Ces produits dérivés peuvent trouver leur application dans trois grandes catégories d'utilisation : l'alimentation humaine, l'alimentation animale et en cosmétique. Pour les têtes de saumon, il existe des voies de valorisation à plus forte valeur ajoutée telles que l'extraction et la purification de lécithines marines, les acides gras essentiels et oméga 3, les peptones (substrats azotés pour cultures bactériennes), et les substances bioactives. Les composés d'intérêt peuvent ensuite être encapsulés sous forme de compléments alimentaires. De ce côté là, le marché est en pleine expansion également. En effet, n'est-il pas question dans les médias de santé, de « forme physique », d'aliments santé et de supplémentation en « bien-être et confort » ?

Les saumons font partie de la famille dits des poissons gras. De ce fait, le saumon est une source importante de lipides, particulièrement riches en acides gras polyinsaturés à longues chaînes de la famille dite des oméga 3, dont les propriétés nutritionnelles sont aujourd'hui bien connues. Ils participent notamment à la prévention de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, certaines formes de cancer, le développement du système nerveux central et les maladies neurodégénératives. Ainsi, les huiles d'origine marine riches en acides gras oméga 3 peuvent rentrer aussi bien dans le cadre des compléments alimentaires que d'un point de vue thérapeutique.

## Introduction

C'est dans ce contexte que nous avons cherché à mettre en valeur les lipides polaires issus des têtes de saumon d'Atlantique (*Salmo salar*). Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux de recherches menés au laboratoire ces dernières années et notamment après la mise au point d'un protocole d'extraction des composés azotés et lipidiques grâce à un procédé relevant d'une extraction enzymatique utilisant des enzymes alimentaires. Cette technique a permis de valoriser les protéines et les lipides issus de coproduits comme les têtes de saumon. Elle a abouti à l'obtention de plusieurs fractions dont les compositions en matières protéiques et lipidiques varient. La fraction qui nous intéresse est notamment très riche en lipides polaires et en acides gras polyinsaturés à longues chaînes.

Partant de là, le principal objectif de cette étude était d'acquérir des connaissances sur les propriétés d'auto-assemblage de ces lipides polaires. Le choix s'est porté sur la phosphatidylcholine pour plusieurs raisons. D'une part, c'est le phospholipide majoritaire dans la composition des membranes biologiques chez les mammifères et un composant majeur dans les membranes de cellules eucaryotes. C'est aussi un constituant critique du surfactant pulmonaire, des lipoprotéines du sérum et de la bile. Cette omniprésence en fait le phospholipide le plus utilisé dans les études sur les modèles de membranes et il existe à ce sujet une littérature très importante disponible sur ce lipide.

L'organisation des lipides polaires lorsqu'ils sont placés en milieu aqueux dépend principalement du type de lipide, de sa concentration et de la température. Dans le cas de la phosphatidylcholine, l'arrangement qui se forme spontanément et le plus communément est la bicouche entourée d'eau. La structuration de la phosphatidylcholine en bicouches puis en vésicules lorsque les bicouches se replient sur elles-mêmes permet de stabiliser les phospholipides dans l'eau. Il devient alors envisageable d'utiliser ces particules comme vecteurs pour les acides gras polyinsaturés à longues chaînes vers les organes cibles. Cependant, il est nécessaire de connaître les propriétés de ces bicouches afin d'optimiser les paramètres d'élaboration des vésicules pour leur garantir une stabilité et une efficacité maximales.

De plus, l'étude de ces lipides d'intérêts sous forme de bicouches permet d'obtenir un modèle de membranes biologiques enrichies en acides gras polyinsaturés. L'origine naturelle de cette phosphatidylcholine lui confère une composition variée de différentes espèces moléculaires, conditions qui se rapprochent le plus des conditions naturelles par rapport aux membranes modèles composées de lipides purs. C'est pourquoi ces lipides représentent un modèle de choix afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des acides gras polyinsaturés dans

## Introduction

les membranes biologiques. Or, l'une des préoccupations majeures qui survient dans la biophysique des membranes concerne la diversité des lipides retrouvés dans la nature. Les informations qui devraient être nécessaires pour traiter cette question incluent les caractéristiques structurales des bicouches lipidiques formées de différents types de lipides. C'est toute la problématique liée à l'étude de phospholipides d'origine naturelle à laquelle nous avons dû faire face ici.

L'approche méthodologique de cette étude a conduit à diviser le travail en plusieurs parties. La première étape a consisté à extraire et purifier la phosphatidylcholine à partir d'un mélange complexe de lipides. Les techniques de chromatographie ont permis d'obtenir une fraction grandement purifiée dont la composition détaillée a ensuite été déterminée. Cette fraction de phospholipides, appelée par la suite « PC de saumon », a été caractérisée en utilisant diverses techniques. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux conditions d'obtention des différentes phases et plus particulièrement à l'élaboration du diagramme de phase PC – eau. Par la suite, nous avons étudié les paramètres structuraux de la PC de saumon en phase lamellaire, mais également sous forme de monocouche à l'interface air – eau. Enfin, la dernière partie a consisté à étudier les propriétés d'hydratation de la PC de saumon par méthode gravimétrique, en modélisant les données obtenues afin de faire ressortir certains paramètres physiques liés à l'hydratation des phospholipides. De manière à évaluer le rôle des acides gras polyinsaturés à longues chaînes présents dans la PC de saumon, nous avons comparé les propriétés de celle-ci avec deux autres phosphatidylcholines d'origine naturelle également, mais dépourvues d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes, à savoir la PC d'œuf et de soja.

La mise en évidence de caractéristiques propres à la PC de saumon qui ne pouvaient être expliquées avec les techniques expérimentales habituelles nous a poussés à compléter notre étude par une approche théorique en utilisant les techniques de simulation par dynamique moléculaire. Là encore, la méthodologie a conduit à diviser l'étude en plusieurs parties. La première étape nécessitait de reproduire les résultats expérimentaux de la PC de saumon en bicouches lamellaires de façon à valider les paramètres choisis pour définir le système de départ. Pour cette partie de l'étude, nous avons décidé de comparer les bicouches de PC de saumon à d'autres bicouches de PC pures contenant une et six doubles liaisons en position *sn*-2 du glycérol, afin de mettre en évidence l'influence de la diversité de composition de la PC de saumon sur les propriétés physiques d'une membrane insaturée. L'influence du taux d'hydratation des bicouches de PC saumon a également été étudiée et a permis d'établir des

## Introduction

hypothèses expliquant le comportement particulier de l'hydratation de la PC de saumon et les conséquences sur sa structuration.

Le présent document se compose de trois chapitres. Le premier regroupe une synthèse bibliographique de présentation des phospholipides et des acides gras polyinsaturés à longues chaînes ainsi que leurs effets sur les membranes. L'accent est notamment porté sur la présentation de l'acide docosahexaénoïque qui, avec ses 22 atomes de carbone et ses six doubles liaisons, constitue l'acide gras le plus long, le plus insaturé et probablement le plus influent des acide gras de la famille des Oméga 3. Le deuxième chapitre présente les différentes méthodes et protocoles qui ont été employés pour cette étude avec également les principes de base de la dynamique moléculaire. Enfin, le dernier chapitre s'articule autour de la présentation des résultats, expérimentaux dans un premier temps et des simulations dans un deuxième temps. La conclusion regroupe l'ensemble des points marquants de cette étude et s'ouvre sur les perspectives d'application d'un tel composé.

## CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### Partie 1 : Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne

#### I. La classe des lipides neutres

Les lipides neutres, au même titre que les lipides polaires, sont une sous-catégorie de la grande famille des lipides. Il n'existe à ce jour aucune définition exacte du terme lipides. La définition la plus globale serait qu'ils soient représentés par les acides gras et leurs dérivés, stéroïdes, terpènes, caroténoïdes et acides biliaires [19].

Contrairement à la plupart des familles de molécules de base du monde vivant qui sont définies par leurs structures chimiques, les lipides sont donc caractérisés par une propriété physique : la solubilité. Ce sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau mais en revanche élevée dans les solvants organiques (méthanol, chloroforme, cyclohexane, éther éthylique, acétone...). Des informations générales sur la chimie des molécules lipidiques peuvent être trouvées dans le « Lipid Handbook » [20]. La classification des lipides peut alors se faire selon différents critères : leurs propriétés physiques à température ambiante (les huiles sont liquides alors que les graisses sont à l'état solide), leur polarité (lipides polaires et lipides neutres), leur caractère essentiel pour l'homme (acides gras essentiels et non essentiels), ou leur structure (simple ou complexe) [19]. Les lipides neutres incluent les acides gras, les glycérides et les stérols alors que les lipides polaires incluent les glycérophospholipides et les glycéroglycolipides.

#### 2. Les acides gras

Les acides gras sont des molécules organiques ne possédant qu'une seule fonction acide organique COOH (carboxyle) à une extrémité et un groupement méthyle CH<sub>3</sub> à l'autre extrémité. Ils sont formés d'une chaîne carbonée à nombre de carbone généralement pair et compris entre 4 et 30. La structure de la chaîne carbonée peut comporter ou non une liaison éthylénique permettant de classer les acides gras en :

- acides gras saturés (AGS) : ils ne comportent que de simples liaisons
- acides gras monoinsaturés (AGMI) : ils possèdent une double liaison

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

- acides gras polyinsaturés (AGPI) : ils possèdent de deux à six doubles liaisons

Les acides gras sont rarement trouvés à l'état libre dans la nature. La plupart du temps, ils sont associés à des alcools *via* des liaisons ester ou amide.

### 3. Les acylglycérols

Le glycérol est un triol qui peut être estérifié avec des acides gras et donner des monoesters (monoacylglycérol ou encore monoglycéride), des diesters (diacylglycérol ou encore diglycéride) et des triesters (triacylglycérol ou triglycérides).

Lorsque les molécules d'acides gras constituant le di ou triester sont identiques, on parlera de diacylglycérol ou triacylglycérol homogènes, dans le cas contraire de diacylglycérol ou triacylglycérol mixte.

## II. Définition et structure des acides gras polyinsaturés à longue chaîne

### 1. Nomenclature

Différentes nomenclatures sont employées pour désigner le nombre et la position des doubles liaisons. La nomenclature chimique fait appel à une numérotation à partir du carboxyle terminal (carbone 1) vers le groupement méthyle. La double liaison est indiquée par le symbole  $\Delta$  suivi d'un chiffre correspondant au premier carbone participant à la double liaison. Dans la nomenclature biochimique ( $n-x$ ) ou « oméga » en référence à une fonction biologique et aux précurseurs, c'est la première double liaison en partant du groupement méthyle terminal qui fait office de référence, les doubles liaisons supplémentaires se trouvant de manière conjuguée vis-à-vis de la première. Les doubles liaisons peuvent exister de manière *cis*, *trans* ou même combinée [21].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

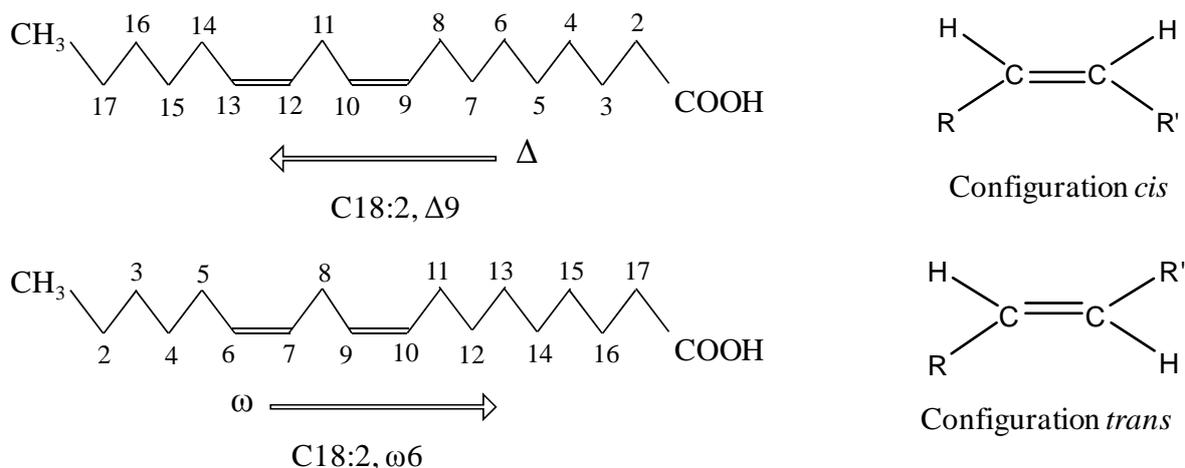


Figure I.1. Différence de nomenclature et de configuration des doubles liaisons pour les acides gras insaturés

Dans la nomenclature, on nomme les acides gras par leur nombre de carbone, puis par le nombre de doubles liaisons avec la position de la première double liaison, on peut également préciser le type de double liaison (*cis* ou *trans*). Dans la nature, la configuration prédominante des doubles liaisons pour les acides gras insaturés est la *cis*. L'isomère *trans* peut être formé durant les procédés d'hydrogénation [22].

### 2. Terminologie

On appelle acides gras indispensables les acides gras qui ne peuvent être synthétisés ni par l'homme ni par les animaux et qui doivent donc être apportés par l'alimentation. Seuls deux acides gras polyinsaturés ont cette dénomination : l'acide linoléique AL, C18:2 n-6 que l'on retrouve principalement dans l'huile de colza et l'huile de soja et l'acide  $\alpha$ -linoléique ALA, C18:3 n-3, que l'on peut trouver dans l'huile de lin ou de noix.

Ces deux acides gras sont les précurseurs métaboliques des deux familles d'acides gras polyinsaturés des séries n-6 et n-3, ayant 20 ou 22 atomes de carbone et contenant jusqu'à 6 doubles liaisons, notamment dans la série n-3 l'acide eicosapentaénoïque EPA, C20:5 et l'acide docosahexaénoïque, DHA C22:6 et dans la série n-6 l'acide arachidonique ARA, C20:4. De part leur importance physiologique, ces trois acides gras, sont appelés également acides gras indispensables.

# CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

## 3. Voies de synthèse

Il a été vu que les acides gras polyinsaturés à la longue chaîne (AGPI-LC) peuvent être synthétisés par l'organisme à partir des deux acides gras essentiels AL et ALA selon plusieurs séquences dont la principale est schématisée dans la Figure I.2 [21]. Deux enzymes sont limitantes dans cette cascade métabolique, il s'agit des  $\Delta 6$  et  $\Delta 5$ -désaturases.

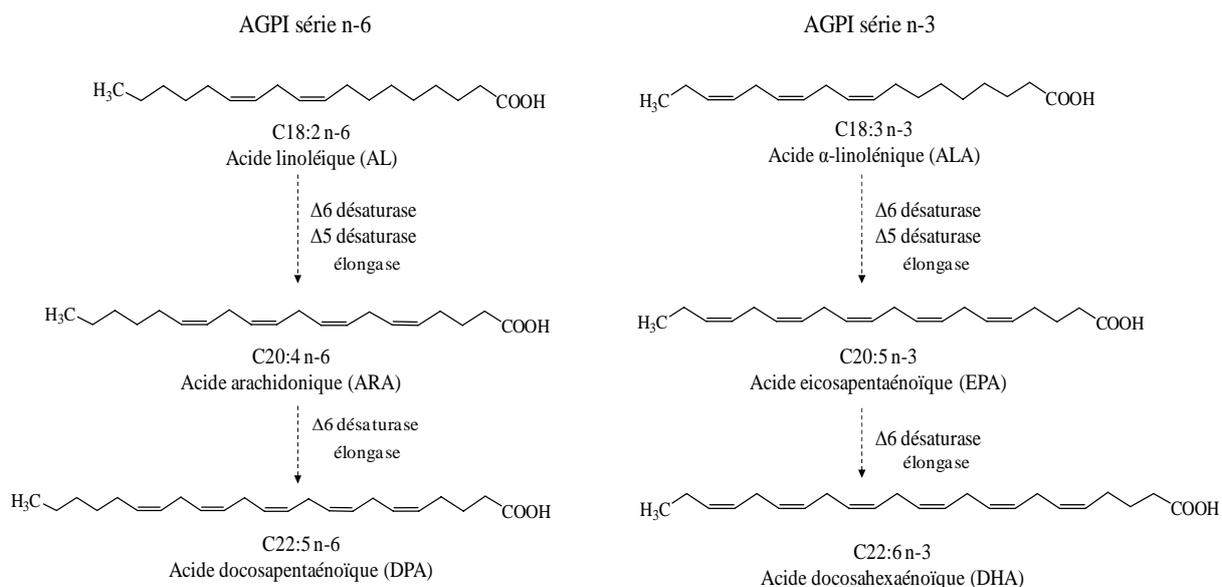


Figure I.2. Voies de synthèses des AGPI-LC à partir des acides gras indispensables.

## III. Principales sources d'AGPI

### 1. Sources végétales

#### *Les graines végétales*

Les quatre sources principales d'huiles végétales en matière de production à travers le monde sont : le soja, le palme, le colza et le tournesol [23]. Parmi ces sources, le soja et le colza contiennent respectivement 7,8% et 9,9% d'ALA, quantités non négligeables pour un acide gras essentiel. Cependant, d'autres sources plus mineures contiennent des proportions supérieures en cet acide gras comme la noix, le lin ou encore le chanvre.

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Malgré leurs proportions importantes en AGS et AGMI, certaines huiles telles que l'huile d'onagre, de melon, de tabac, de carthame ou encore de graines de paprika contiennent une forte teneur en AL avec des teneurs supérieures à 60%. Cependant, l'AL en trop grande quantité étant associé à des risques pro-inflammatoires, il est nécessaire d'équilibrer les apports en AL et ALA.

Le tableau I.1 présente les teneurs en AGPI, AL et ALA des principales graines végétales ainsi que le rapport n-3/n-6.

Tableau I.1. Composition en lipides des principales sources végétales d'AGPI classées selon leur teneur en AGPI.

Source	Espèce	% AGPI	% LA	% ALA	rapport n-3/n-6
Noix	<i>Juglans regia</i>	84	74	10	0,1
Onagre	<i>Oenothera biennis</i>	83	74	< 1	< 0,1
Sauge	<i>Salvia hispanica</i>	81	20	61	3,1
Graines de kiwi	<i>Actinidia chinensis</i>	80	15	65	4,3
Chanvre	<i>Cannabis sativa</i>	79	56	2	0,3
Carthame	<i>Carthamus tintorius</i>	77	76	0.3	0,01
Cassis	<i>Ribes nigrum</i>	75	48	12	0,2
Tabac	<i>Nicotiana tabacum</i>	72	71	1	0,01
Shiso	<i>Perilla frutescens</i>	70	15	55	3,7
Airelle rouge	<i>Vaccinium oxycoccos</i>	68	44	22	0,5
Argousier	<i>Hippophae rhamnoides L.</i>	67	38	29	0,7
Graines de pourpier	<i>Portulaca oleracea</i>	66	34	32	0,9
Raisin	<i>Vitis vinifera</i>	65	64	< 1	0,01
Graines de melon	<i>Cucumis melo</i>	64	64	< 1	< 0,1
Soja	<i>Glycine max</i>	60	52	< 1	0,1
Lin	<i>Linum usitatissimum</i>	54	17	55	3,3
Colza	<i>Brassica napus</i>	31	21	10	0,4

Source : [23]

### 2. Sources animales

La conversion des acides gras essentiels (AL et ALA) en AGPI-LC est très faible dans l'organisme humain. Elle a été estimée à moins de 10% pour l'EPA et moins de 5% pour le DHA [24]. Les sources marines telles que poissons et crustacés constituent les majeures sources d'acide gras polyinsaturés oméga 3.

Le Tableau I.2 présente les principales sources marines d'AGPI-LC. Le flétan, le hareng et le maquereau roi sont les poissons ayant un taux de lipides le plus élevé mais des teneurs en

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

EPA et DHA relativement faibles. Les œufs de truite, la sardine, l’anchois et le krill ont des teneurs en lipides totaux plus faibles (<10%) mais des teneurs en EPA et DHA supérieures à 30%.

Tableau I.2. Composition en lipides et acides gras de diverses sources marines. Les teneurs en lipides totaux (LT) sont donnés en % de matières sèches et les teneurs en acides gras en % relatifs.

Source	Espèce	LT	AGPI	ALA	EPA	DHA
<sup>a</sup> Flétan	<i>Rheinhardtius hippoglossoides</i>	13,8	1,4	Tr.	0,5	0,4
<sup>a</sup> Hareng	<i>Clupea harengus</i>	13,9	2,4	0,1	1	0,7
<sup>a</sup> Maquereau roi	<i>Scomberomorus cavalla</i>	13	3,2	-	1	1,2
<sup>a</sup> Saumon royal	<i>Onchorhynchus tshawytscha</i>	10,4	2,1	0,1	0,8	0,6
<sup>c</sup> Œufs de truite	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	9,6	46,4	-	11,5	24
<sup>a</sup> Pompanos	<i>Trachinotus carolinus</i>	9,5	1,1	-	0,2	0,4
<sup>d</sup> Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	7,4	43,7	1,1	11,2	21,7
<sup>b</sup> Krill	<i>Euphausia superba</i>	7,2	33,7	0,7	16,1	14,1
<sup>a</sup> Carpe	<i>Cyprinus encrasicolus</i>	5,6	1,4	0,3	0,2	0,1
<sup>a</sup> Thon albacore	<i>Thunnus albacores</i>	4,9	1,8	0,2	0,3	1
<sup>d</sup> Anchois	<i>Engraulis encrasicolus</i>	4,5	43,3	1,3	12,7	19,1
<sup>a</sup> Truite arc-en-ciel	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	3,4	1,2	0,1	0,1	0,4
<sup>d</sup> Maquereau bâtard	<i>Trachurus trachurus</i>	2,2	35,4	0,4	8,3	16,6

Tr. : traces ( < 0.05%). Sources : (a) [25], (b) [26], (c) [27], (d) [28]. Pour (a), les données correspondent à un % de matière consommable (filets).

#### IV. Intérêts physiologiques des AGPI-LC

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne des séries oméga 3 et 6 participent à une multitude de processus physiologiques, autres qu'énergétiques. Il est important de différencier les AGPI-LC de la famille des oméga 3 de la famille des oméga 6. En effet, les mécanismes d'action sont différents et donc leurs cibles dans le corps humain diffèrent également. Les recherches sur les AGPI se sont accrues depuis la découverte de leurs actions préventives et thérapeutiques sur de nombreuses pathologies il y a une trentaine d'années. On dénombre des études à la fois expérimentales ou cliniques (tirées des conclusions sur l'effet d'une consommation accrue en poissons gras ou en compléments alimentaires) montrant les bienfaits de ces acides gras [29].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### 1. Effets des oméga 3 sur la santé

#### *Maladies cardiovasculaires*

L'essentiel des recherches concerne l'effet des AGPI n-3 sur la prévention des maladies cardio-vasculaires. Bien qu'il existe des centaines de références sur le sujet, une revue complète sur l'effet des AGPI oméga 3 et l'athérosclérose d'un point de vue nutritionnel est sortie en 1994 [30]. L'athérosclérose est une perte d'élasticité des artères due à la sclérose provoquée par l'accumulation de corps gras (triacylglycérols et cholestérol LDL (low density lipoprotein)). Or, il a été montré que les AGPI oméga 3 participent à la réduction du taux de triacylglycérols dans le sang et augmentent le taux de cholestérol HDL (high density lipoprotein) chez les patients atteints d'hypertriglycémie. Ils sont associés ainsi à la réduction du risque de mort subite par arythmie cardiaque [31], [32], [33].

#### *Cancers*

Les AGPI sont également associés dans la prévention de plusieurs types de cancers. L'un des mécanismes proposés de l'action de ces acides gras sur la modulation des cellules cancéreuses et tumorales se rapporte à l'oxydation des lipides. Les AGPI-LC peuvent induire l'apoptose de cellules tumorales [34]. Une revue de Das [35] traite des principaux événements métaboliques répertoriés dans les cellules tumorales et qui sont reliés au métabolisme des AGPI. Ainsi, durant ces dernières années, des études épidémiologiques ont suggéré une diminution de l'incidence des cas de cancers du sein chez des populations consommant beaucoup de poissons gras [36], [37]. Cependant, cet effet n'est attribué qu'aux AGPI oméga 3 ou lors d'une augmentation du ratio oméga 3/oméga 6, les AGPI oméga 6 étant associés à une augmentation de la cancérogénèse mammaire chez les rongeurs [38]. Les AGPI-LC oméga 3 ont également des effets protecteurs contre le cancer du côlon même si d'autres études contrastent sur les prémisses qui admettent que les omégas 3 diminuent le risque de ce cancer [39]. Enfin, une revue de Astorg [40] regroupe les principaux résultats concernant l'effet des AGPI (oméga 3 et 6) sur le cancer de la prostate mais les résultats à ce sujet sont mitigés : la consommation d'AGPI-LC oméga 3 est associée à une diminution des risques mais peu d'études épidémiologiques confirment cette tendance alors que l'ALA pourrait augmenter le facteur de risque.

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### *Action contre le diabète et l'obésité*

L'obésité tend à développer le risque de diabète de type 2. Or, le diabète de type 2 ainsi qu'un taux élevé de glucose dans le sang augmentent le risque de mortalité par maladie cardiovasculaire. Une alimentation riche en acides gras saturés et pauvre en AGPI et AGPI-LC oméga 3 tend généralement à augmenter l'adiposité entraînant un risque accru de diabète de type 2 et à diminuer la sensibilité à l'insuline [41]. Plusieurs revues recourent les informations disponibles concernant l'effet des AGPI omégas 3 sur la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sur des sujets humains [42], [43]. Les conclusions sont tirées d'études épidémiologiques et cliniques et le potentiel de ces acides gras pour augmenter l'efficacité des interventions actuelles sur la prévention et le traitement des diabètes de type 2.

### 2. Effet des AGPI oméga 6 sur la santé

Il est admis de nos jours que les régimes occidentaux sont trop riches en acides gras oméga 6 par rapport aux oméga 3. Or des quantités excessives d'acides gras oméga 6 (et de ce fait, un ratio oméga 6/oméga 3 élevé) va influencer certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, et les maladies inflammatoires et auto-immunes [44].

Les acides gras oméga 6 sont principalement impliqués dans les mécanismes de réaction inflammatoire puisque la métabolisation de l'acide arachidonique (ARA) donne lieu à la production de prostaglandines (série 1 et 2), leucotriènes et thromboxanes [34]. Certaines études ont montré qu'une augmentation de la consommation en C18:3 n-6 (acide  $\gamma$ -linoléinique) augmentait le taux de prostaglandine de type 1 (PGE1) mais diminuait le taux de prostaglandine de type 2 (PGE2) [34]. Or, les PGE2 sont responsables en partie de la suppression de l'effet d'auto-immunité des cellules, ce qui englobe la prolifération des lymphocytes et la production du facteur de croissance interleukine-2. De ce fait, une augmentation de la consommation en acide  $\gamma$ -linoléinique peut influencer la fonction immunitaire de par ces réactions interconnectées.

L'une des manifestations cliniques des maladies inflammatoires est la polyarthrite rhumatoïde (PR). Les éicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique jouent un rôle dans la PR et l'efficacité des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens dans la PR montre l'importance de la voie métabolique pro-inflammatoire de l'acide arachidonique dans la pathophysiologie de la maladie [45].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### 3. Recommandations pour les AGPI-LC

L'association américaine pour le cœur (AHA) recommandait en 2003 les doses suivantes : manger une variété de poissons gras au moins une fois par semaine pour les personnes ne présentant pas de maladies cardiaques, consommer environ 1 g de EPA et DHA par jour (de préférence provenant de poissons gras) pour les personnes présentant des maladies cardiaques et consommer entre 2 et 4 g de EPA et DHA sous forme de complément alimentaire pour les personnes nécessitant de diminuer le taux de triacylglycérols dans le sang [46].

En France, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) recommande également des apports nutritionnels pour l'ALA et le DHA variables selon les différents groupes de population. Pour les adultes, l'apport nutritionnel conseillé de l'ALA est de 2 g/jour pour l'homme et 1,6 g/jour pour la femme. L'apport nutritionnel conseillé en DHA est quant à lui de 120 mg/jour pour l'homme et 100mg/jour pour la femme (<http://www.afssa.fr/index.htm>).

Il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle sur la meilleure forme de supplémentation des apports en AGPI-LC oméga 3.

La plupart des études sont basées sur une alimentation comportant une consommation accrue en poissons gras, en huile de poisson ou juste en AGPI directement (principalement DHA). Avec l'extension des études menées sur les bienfaits des oméga 3 sur la santé, on a assisté à l'émergence de produits dits nutraceutiques ou aliments fonctionnels (selon que le complément actif se trouve isolé ou mélangé à un aliment). L'apport par les phospholipides sous forme de vésicules enrichies en AGPI-LC peut être considéré comme une source prometteuse puisqu'il a été montré qu'une fois la barrière intestinale passée, les AGPI oméga 3 étaient préférentiellement transportés jusqu'au cerveau [47], [48]. De plus, lorsque le DHA est incorporé avec les PL, il se trouve être plus résistant envers l'oxydation que lorsqu'il est estérifié sur des triacylglycérols ou lorsqu'il est sous forme d'éthyl ester [49]. La biodisponibilité des AGPI est également accrue lorsqu'ils sont vectorisés par les PL par rapport à l'apport sous forme d'huile de poisson (correspondant donc à des AGPI estérifiés sur des TG) [50]. En effet, la structure des liposomes résiste à des variations de pH rencontrées lors des processus digestifs [51].

### V. Le DHA, propriétés d'un acide gras unique

#### 1. Localisation

Les AGPI-LC particulièrement l'EPA et le DHA, sont présents sur les membranes cellulaires des vertébrés. Les AGPI-LC représentent 21 – 36% du pourcentage total d'acides gras dans les membranes des cellules, mais la proportion d'EPA et de DHA varie énormément suivant les tissus. Chez les mammifères notamment, le DHA est trouvé en forte concentration uniquement dans la rétine (19.5%), les testicules (8.7%) et le cerveau (7.2%) [52]. Ces pourcentages sont donnés pour l'espèce humaine mais cette tendance est générale pour d'autres espèces de mammifères. Cette distribution particulière du DHA indique une implication fondamentale de celui-ci dans la membrane de ces tissus. Des espèces moléculaires de phospholipides contenant un DHA en *sn*-1 et *sn*-2 ont même été retrouvées dans certains tissus [53]. Dans ces tissus où le taux de DHA est déjà élevé, aucune augmentation n'est visible avec un régime enrichi en DHA. De plus, une fois incorporé, le DHA est plus facilement métabolisé par les cellules aux dépens d'autres acides gras [54]. Pour contraster les quelques tissus qui contiennent du DHA en fortes proportions, on retrouve souvent dans d'autres tissus du DHA en dessous de 5% du pourcentage total des acides gras présents sur les phospholipides de membranes. Dans ces tissus, le pourcentage de DHA peut être enrichi entre 2 et 10 fois par des compléments d'aliments enrichis en AGPI oméga 3 [54]. Pour les tissus oculaires notamment où le DHA est fortement présent, Anderson et *al.* ont trouvé que la totalité du DHA était présente en position *sn*-2 du glycérol pour toutes les classes de phospholipides [55].

#### 2. Implication sur la santé

Dans une revue traitant des propriétés associées à l'incorporation du DHA dans les membranes, Stillwell détaille les diverses pathologies dans lesquelles le DHA apporte une action positive, parmi lesquelles les maladies neuro-dégénératives (dépression, schizophrénie, sclérose), les maladies cardio-vasculaires, le cancer du colon, la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme, le lupus, l'acuité visuelle, les maladies du foie et respiratoires, la maladie de la fonction peroxyzomale (syndrome de Zellweger), les dermatites, le psoriasis, la fibrose kystique et la malaria [56].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### *Développement du cerveau*

Le cerveau est le deuxième organe qui concentre la plus grosse quantité de lipides, après le tissu adipeux. Le cerveau d'un adulte contient approximativement 50 – 60% de son poids sec en lipides. Approximativement 35% des acides gras sont des AGPI dont la plupart sont des AGPI-LC [52]. Parmi eux, le DHA et l'ARA sont les AGPI-LC qui jouent le rôle le plus important dans la fonction nerveuse.

La quantité totale de DHA dans le cerveau augmente de manière considérable durant la croissance du cerveau, que ce soit par l'accroissement de la taille du cerveau mais aussi par la proportion en DHA elle-même qui augmente simultanément. En effet, durant la croissance du cerveau, la teneur totale en DHA est multipliée d'un facteur 30, c'est pourquoi l'apport en DHA se doit d'être substantiel pour satisfaire la demande durant cette période [52].

Svennerholm a démontré que la composition en acides gras évolue pour chaque phospholipide membranaire dans un cerveau humain normal, même si cette évolution reste mineure après l'enfance [57]. La proportion en acides gras varie également considérablement d'une classe de phospholipide à une autre. Ainsi, la teneur en DHA dans la matière grise évolue au cours d'une vie de 10,8 à 33,9% pour la phosphatidyléthanolamine alors qu'elle passe de 1,2 à 5,3% pour le phosphatidylinositol et de 0,7 à 3,6% pour la phosphatidylcholine dans le cortex cérébral.

Au cours du développement neuronal, l'action du DHA s'observe à différents niveaux : ajouté au milieu de culture de neurones de l'hippocampe, il induit la croissance des dendrites [58]. De plus, chez les animaux soumis à un régime carencé, les neurones sont plus petits que ceux des animaux soumis à un régime équilibré [59]. Contrairement à cela, des études cliniques basées sur l'effet de compléments en DHA dans l'alimentation démontrent que les posologies les plus fortes en oméga 3 (entre 2 et 4 g par jour) peuvent améliorer les symptômes des troubles psychiatriques sévères [60]. Chez l'humain enfin, l'importance d'un apport suffisant en AGPI-LC durant le développement mental de l'enfant a fait l'objet de recherches intensives.

### *DHA et maladies neuro-dégénératives*

Des études épidémiologiques suggèrent que la consommation de DHA est associée à une diminution de l'incidence de la maladie d'Alzheimer tandis que des études sur animaux ont montré que la prise orale de DHA pouvait réduire des pathologies cérébrales de type Alzheimer [61], [62]. Boudrault et ses collaborateurs ont décrit les mécanismes potentiels d'action du DHA [63]. Actuellement, ces derniers ne semblent pas clairement élucidés. Tout

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

d'abord, le DHA comme les AGPI n-3 agirait sur la diminution du taux de cholestérol dans le sang, et un taux élevé de cholestérol sanguin est associé à une forte production de peptide  $\beta$ -amyloïde qui s'agrège et forme par la suite des plaques. Par ailleurs, dans les cerveaux atteints de maladie d'Alzheimer, des quantités élevées d'enzymes impliquées dans la transformation de l'ARA en médiateurs pro-inflammatoires (cyclooxygénase COX-2) ont été retrouvées. Or, le DHA a des effets antagonistes à l'ARA concernant ses propriétés pro-inflammatoires puisqu'il induirait une diminution du taux d'ARN messager de la COX-2. Il a été suggéré également que le DHA pouvait agir comme une molécule neuro-protectrice qui augmenterait la survie cellulaire grâce à la production de neuroprotectine D1, un médiateur dérivé du DHA. En plus de la réduction du taux de cholestérol dans le plasma, le DHA serait également directement impliqué dans la diminution du taux de  $\beta$ -amyloïde dans le plasma. En effet, le DHA exerce un effet antioxydant observé par une augmentation de l'activité de la glutathion réductase. L'effet antioxydant s'observe également par une diminution de l'accumulation de peroxydes dans le cortex et l'hippocampe de rats atteints de maladie d'Alzheimer. Comme l'accumulation de peptide  $\beta$ -amyloïde est associée à une augmentation de l'oxydation dans le cerveau, le DHA pourrait permettre de ralentir le phénomène oxydatif et donc, l'accumulation de  $\beta$ -amyloïde.

Il a été également proposé que la perte de mémoire serait corrélée à une diminution des synapses, même si le mécanisme de dysfonctionnement synaptique dans la maladie d'Alzheimer n'a pas clairement été élucidé [64]. Or, on sait que les synapses sont naturellement enrichies en DHA.

Cependant, l'ingestion de DHA sous forme de complément n'a pas montré de diminution du taux de déclin cognitif et fonctionnel chez une population de patients atteints légèrement à modérément de la maladie d'Alzheimer [61].

### *Propriétés anti-inflammatoires*

Comme il l'a été dit auparavant, les AGPI-LC oméga 3 ont des effets antagonistes aux AGPI-LC oméga 6 vis-à-vis du processus inflammatoire. La plupart des médiateurs dérivés de l'ARA sont principalement pro-inflammatoires alors que ceux formés à partir de l'EPA et du DHA sont anti-inflammatoires [62]. En effet, l'ingestion d'EPA et de DHA à partir de poissons gras a démontré les caractéristiques suivantes [25] : une diminution de la production de la thromboxane  $A_2$ , un composé potentiel favorisant l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction, une diminution de la formation de leucotriène  $B_4$  qui induit l'inflammation

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

et une augmentation de la production de prostacycline, composé qui prévient de l'agrégation plaquettaire et favorise la vasodilatation.

### *Maladies cardiovasculaires*

L'impact de la consommation régulière (au moins une fois par semaine) de poissons riches en oméga 3 sur la diminution du taux de mortalité par cardiopathies coronariennes (incluant la mort subite par arrêt cardiaque, l'infarctus du myocarde, le pontage aorto-coronarien et l'angioplastie) est fortement documenté dans la littérature [65], [66]. La plupart des études épidémiologiques ont été réalisées avec une supplémentation en huile de poisson (ou consommation de poissons gras) mais la plupart des bénéfices ont été attribués à la présence de l'EPA et du DHA [67]. En effet, ces deux acides gras abaissent la pression sanguine et préviennent le développement de l'hypertension, l'un des facteurs critiques qui peuvent résulter en une pathologie de type cardiovasculaire telle que l'athérosclérose ou en congestion [68].

### 3. Influence du DHA sur les protéines membranaires

Les membranes contiennent entre 20 et 80% de protéines [3]. Ce sont elles qui sont les composés biochimiquement actifs de la membrane. Elles peuvent avoir une fonction enzymatique, de transporteur, de récepteur, de pores, etc. et permettent la distinction entre chaque membrane de façon particulière. Il existe deux types de protéines membranaires : celles qui sont immergées au cœur de la membrane (les protéines intégrées) et celles qui se situent à l'interface, d'un côté ou de l'autre. Il est évident que la conformation des chaînes hydrocarbonées et leur mobilité peuvent influencer la conformation des protéines membranaires et, de ce fait, leur fonctionnalité [22].

Erickson décrit avec précision l'effet que peuvent avoir les phospholipides sur les protéines membranaires [2]. En effet, le fonctionnement global d'une membrane biologique est contrôlé à la fois par les protéines membranaires mais également par les composés lipidiques la constituant (principalement les phospholipides). Dans une bicouche ayant une distribution hétérogène des protéines, à la fois à la périphérie et à l'intérieur de la bicouche, il y aura une certaine proportion de phospholipides qui vont interagir avec les composés protéiques pour donner à la membrane toute son intégrité, d'un point de vue structural et fonctionnel. Ainsi, la proportion de protéine interagissant avec la protéine est dictée par les propriétés de la protéine telles que sa densité, son type, sa taille et son état d'agrégation.

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

De manière générale, des interactions sélectives ou non entre les phospholipides et l'interface de la protéine peuvent avoir lieu : en cas d'absence de sélectivité, les lipides agissent comme un « solvant », conférant à la protéine une forme adéquate à son activité et sa mobilité. Dans ces conditions, la fluidité membranaire peut altérer l'activité de la protéine membranaire, puisque des membranes rigides peuvent réduire ou stopper la fonction de la protéine et inversement. L'exemple le plus probant dans ce cas là est celui du fonctionnement de la rhodopsine, un récepteur membranaire, couplée à la protéine G, et située dans les membranes contenant un fort taux en DHA. La rhodopsine est une protéine avant tout responsable de la sensibilité à la lumière. Son milieu environnant est riche en AGPI et en cholestérol. Des mesures en biophysique ont montré que les lipides insaturés et le cholestérol avaient des effets significatifs sur la stabilité et le fonctionnement de la rhodopsine, et notamment le DHA qui déstabilise la protéine et augmente la cinétique du photocycle, alors que le cholestérol a des effets inverses [69]. Un de ces mécanismes non-spécifiques de modulation du fonctionnement protéique par le DHA a été mis en évidence avec la gramicidine où l'adsorption de DHA dans la bicouche pouvait modifier l'énergie de déformation des membranes qui survient lors d'un changement de conformation de la protéine à l'interface protéine/membrane [70]. D'autres études se sont intéressées à l'effet des AGPI et notamment du DHA sur le fonctionnement des protéines membranaires comme les canaux ioniques [70], ou les protéines de classe I issue de complexe majeur d'histocompatibilité [4].

Si les protéines cellulaires sont déterminées par la génétique, la composition des membranes cellulaires en AGPI dépend elle grandement de la consommation alimentaire. Il devient alors possible d'influer sur le fonctionnement des protéines membranaires de manière indirecte en contrôlant l'alimentation.

### VI. Le risque d'oxydation

#### 1. Mécanisme généraux de l'oxydation des lipides

Les deux composés majeurs impliqués dans l'oxydation des lipides sont les acides gras polyinsaturés et l'oxygène. La température, la lumière et les métaux sont des facteurs qui contribuent à accélérer le processus d'oxydation. Dans ce procédé, l'oxygène de l'atmosphère se greffe sur certains acides gras en créant des intermédiaires instables et qui peuvent ensuite former des composés indésirables. L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

- l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photo-sensibilisateurs
- l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase

Le détail des différentes réactions impliquées dans le processus d'oxydation est largement décrit par Erickson [1]. Bien que la photo-oxydation et l'oxydation enzymatique demeurent des phénomènes non négligeables, le procédé prédominant par lesquels les acides gras insaturés et l'oxygène interagissent est le mécanisme des radicaux libres caractérisés par trois phases principales : initiation, propagation et terminaison (voir Fig. I. 3) :

- initiation : en présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre de lipide ( $R^\circ$ ) (radical lipoyle).

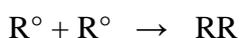


Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être produit par des radiations ionisantes, des traces métalliques, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène.

- propagation : les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes.



- terminaison : Les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical libre.



Les hydroperoxydes peuvent également se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyle et un radical hydroxyle. Le radical alcoyle réagit avec d'autres substrats et propage la réaction en chaîne. Il peut également subir une scission carbone-carbone de part et d'autre du radical pour former un radical alkyl et un radical vinyle. Le radical alkyl peut réagir avec un hydrogène, un radical hydroxyle ou une molécule d'oxygène générant ainsi des hydrocarbures, des alcools et d'autres hydroperoxydes. Le radical vinyle peut réagir avec un radical hydroxyle, un radical hydrogène ou l'oxygène moléculaire pour générer des aldéhydes et des hydrocarbures [1].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

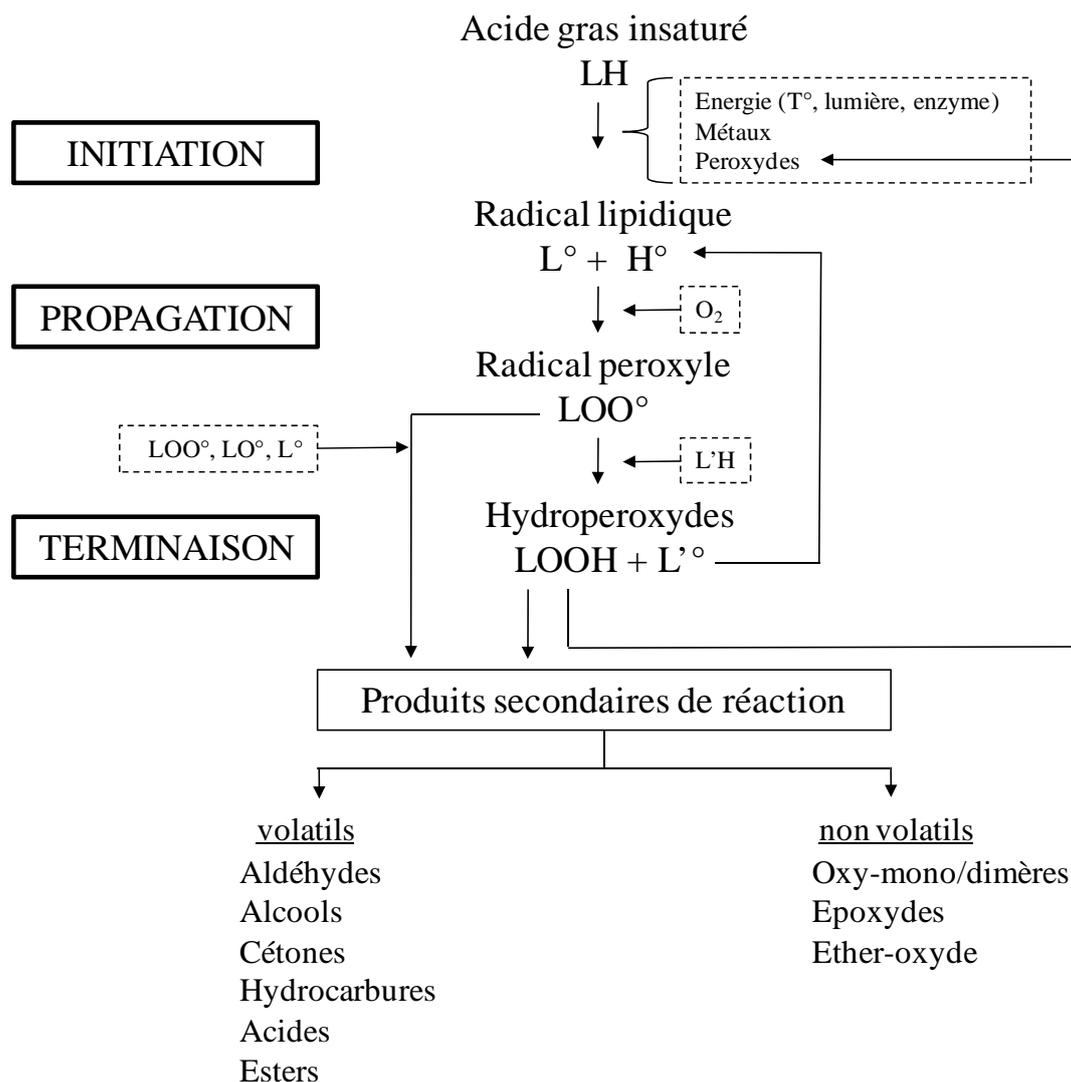


Figure I.3. Mécanisme d'auto-oxydation des lipides polyinsaturés d'après [1].

### 1. Potentiel d'oxydation des lipides

Les AGPI contenant plusieurs insaturations, ce sont les composés principalement touchés par l'oxydation des lipides puisque l'énergie de dissociation des liaisons C-H au niveau de la position bis-allylique du groupement méthylène (position située entre deux doubles liaisons adjacentes) est la plus faible. Ainsi, plus on augmente la longueur de chaîne et le nombre d'insaturations, plus le risque d'oxydation est grand [71]. Dans une étude impliquant l'utilisation de solutions homogènes de lipides purifiés, une corrélation linéaire a été établie entre le nombre de positions méthylène bis-allylique et l'oxydabilité des lipides [72].

Les études *in vitro* ont permis d'établir avec précision la contribution de chaque classe de lipide (triacylglycérols, phospholipides et acides gras libres) vis-à-vis de la stabilité à

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

l'oxydation. Les acides gras libres semblent être le plus exposé et, de ce fait, s'oxydent plus rapidement que les triacylglycérols, surtout lorsqu'ils sont sous forme encapsulée [73]. La stabilité face à l'oxydation est encore accrue pour les phospholipides sous forme de liposomes comparée aux triacylglycérols sous forme d'émulsion [71], [74].

### 2. Stabilité des produits sensibles à l'oxydation

L'oxydation des AGPI entraîne la dégradation de ces derniers par la perte progressive des doubles liaisons et conduit à la formation de produits d'oxydation tels que les peroxydes et les composés volatils (Fig. I.3). L'apparition de produits secondaires volatils peut modifier les propriétés physico-chimiques du milieu environnant. Ainsi, pour palier à ce problème, le moyen de protection le plus efficace est la présence d'antioxydants, qui peuvent retarder ou ralentir la cinétique d'oxydation. L'inhibition peut prendre deux formes : une diminution de la vitesse maximum d'oxydation ou une diminution du taux maximum d'oxydation [1]. Le mécanisme d'action général des antioxydants repose sur une compétition entre l'antioxydant et le lipide pour céder un atome d'hydrogène au radical peroxyde.

Les tocophérols sont les antioxydants typiques les plus importants chez les humains [75]. Les tocophérols sont régénérés en présence d'un autre antioxydant tel que l'acide ascorbique. Il existe d'autres composés ayant une fonction antioxydante similaire à l' $\alpha$ -tocophérol, en agissant comme des récupérateurs de radicaux peroxydes et/ou d'anion d'oxygène superoxyde. Ce sont par exemple les caroténoïdes, les polyphénols et le glutathion [1].

**Partie 2 : Les phospholipides, structure et propriétés**

I. Structure et classification

1. Structure

*Le squelette*

Les phospholipides sont divisés en deux classes principales selon qu'ils contiennent un squelette glycérol ou sphingosyl [2]. Chez les glycérophospholipides, une ou deux chaînes d'acide gras  $R_1$  et  $R_2$  sont estérifiées au glycérol et d'un acide phosphorique lié en position *sn*-3 du glycérol, tandis que pour les sphingophospholipides, une chaîne d'acide gras est ajoutée au squelette (Fig. I.4).

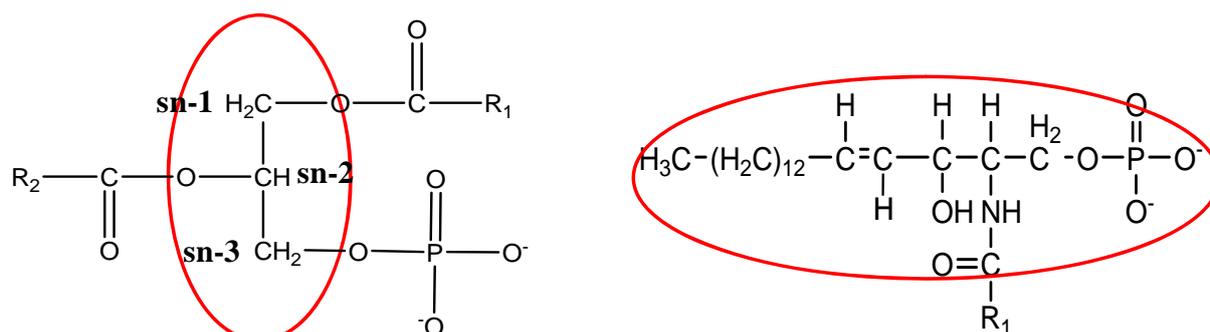


Figure I.4. Structure des squelettes glycérophosphate et sphingosylphosphate auxquels sont liés des radicaux acides gras  $R_1$  et  $R_2$ . Les cercles représentent les bases glycérol (à gauche) et sphingosine (à droite) ; *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3 représentent la numérotation stéréo-spécifique au niveau du glycérol, d'après [2].

Les acides phosphatidiques n'existent que rarement à l'état naturel. Ce sont leurs dérivés où une fonction acide de l'acide phosphorique est estérifiée par un alcool que l'on retrouve.

Généralement, on a tendance à classer également dans la catégorie des phospholipides la sphingomyéline car elle contient aussi un acide phosphatidique. Cependant, son squelette est composé d'une sphingosine auquel est lié un acide gras.

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### *L'alcool supplémentaire*

L'acide phosphorique est estérifié par un alcool qui peut être un alcool aminé ou un polyol sans azote (Fig. I.5) :

- les alcools aminés peuvent être la sérine, l'éthanolamine (produit de décarboxylation de la sérine) et la choline (dérivé N-triméthyle de l'éthanolamine).
- les polyols non azotés peuvent être le glycérol ou l'inositol.

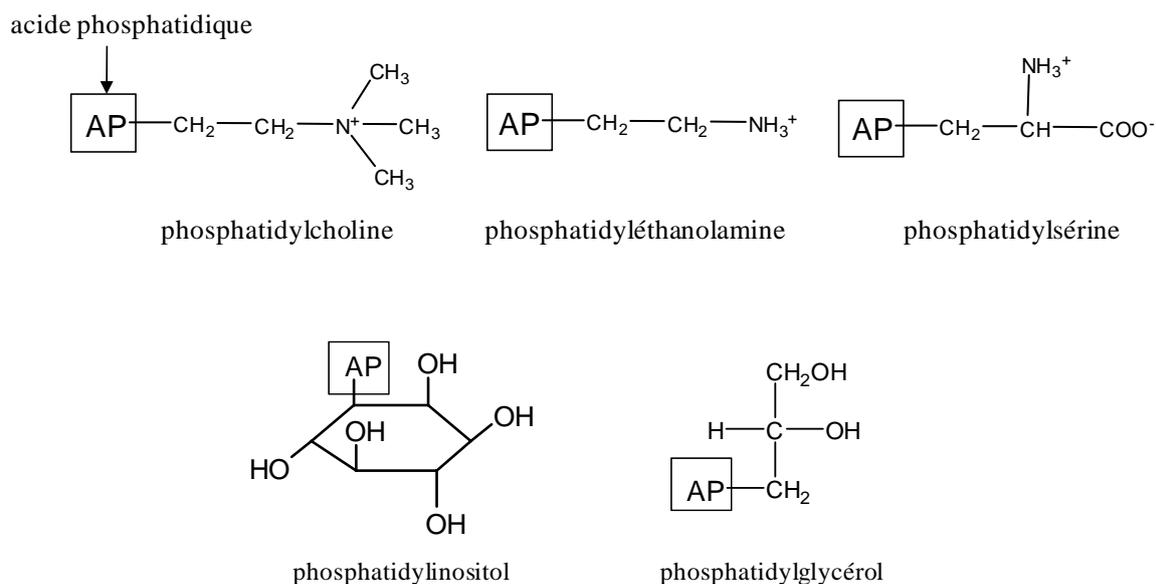


Figure I.5. Résidus rattachés à l'acide phosphatidique de la tête polaire [3]

### *Les acides gras estérifiés*

Dans la plupart des cellules animales, les phospholipides diacylés dont les deux chaînes sont structurellement différentes sont prédominants. Plus précisément, les deux acides gras sont estérifiés en position *sn*-1 et *sn*-2 du squelette glycérol. Concernant la régio-sélectivité, il a été montré que les espèces moléculaires les plus abondantes pour les phospholipides de membranes sont constitués d'un acide gras saturé en *sn*-1 alors que les acides gras insaturés se retrouvent en *sn*-2 [76], [55], [77]. En particulier, la chaîne saturée en *sn*-1 contient un nombre pair d'atomes de carbone allant de 14 à 22 mais ce sont principalement les chaînes palmitiques (16:0) et stéariques (18:0) qui sont les plus représentées. La chaîne insaturée en position *sn*-2 peut avoir de 16 à 22 atomes de carbone et contenir de 1 à 6 doubles liaisons *cis*.

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Certaines études ont montré que les phospholipides sont enrichis en AGPI-LC par rapport aux triacylglycérols [78], [79]. Chez les organismes marins notamment, la teneur en EPA et DHA dans les phospholipides peut atteindre jusqu'à 30 % des acides gras totaux. (Tableau I.3).

Tableau I.3. Composition des acides gras majoritaires issus des phospholipides de muscle comestible de cabillaud (*Gadus morhua*) et saumon d'Atlantique (*Salmo salar*), comparée à celle de corps éviscérés de capelan (*Mallotus villosus*) et à celle de muscle adducteur de coquille Saint-Jacques (*Placopecten magellanicus*).

Acides gras	Cabillaud	Saumon d'Atlantique sauvage	Saumon d'Atlantique d'élevage	Capelan	Coquille Saint-Jacques
14:0	1.4	1.6	1.1	2.1	2.1
16:0	19.6	17	18.7	20.9	19.8
16:1	3.8	2.7	5.2	2.6	4.2
18:0	3.5	2.3	2.7	6.5	2.6
18:1	13.8	8.3	9	11.4	4.7
20:1	3	2.5	0.4	3.1	2
22:1	1	0.7	0.1	2.7	-
18:2 n-6	0.7	3.7	1.7	1	0.5
18:3 n-3	0.1	0.3	1.5	0.7	0.3
18:4 n-3	0.4	-	-	0.6	2.3
20:4 n-6	2.5	1.6	10.4	0.5	1.2
20:5 n-3	17	7.7	5.5	13.5	18.5
22:5 n-3	1.3	1.9	3.4	2.1	1.1
22:6 n-3	29.8	35.1	21.8	26.5	22.9

Source : [46].

### 2. Classification

Les phospholipides sont généralement classés en fonction du deuxième alcool sur la tête polaire qui leur confère leurs propriétés spécifiques.

#### *La phosphatidylcholine*

La phosphatidylcholine (PC) contient un groupement choline estérifié à l'acide phosphatidique (Fig. I.5). C'est le phospholipide le plus abondant dans les membranes des cellules animales [3], [80]. C'est également le phospholipide majoritairement présent sur la couche externe des membranes cellulaires animales, ces dernières présentant une asymétrie de composition entre la couche externe et interne [80]. La PC est également un constituant critique des surfactants de poumons humains, des lipoprotéines du sérum, de la bile et représente le phospholipide le plus utilisé dans les modèles d'étude de membranes [81]. En

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

effet, depuis une vingtaine d'années, on note en moyenne une fréquence de 400 études par an sur la PC. Au pH physiologique, La PC possède à la fois une charge négative portée par le groupement phosphate et une charge positive portée par le groupement choline. De ce fait, c'est un PL neutre à pH physiologique.

### *La phosphatidyléthanolamine*

La phosphatidyléthanolamine (PE) contient un groupement éthanolamine estérifié à l'acide phosphatidique (Fig. I.5). La PE est généralement le deuxième phospholipide le plus abondant dans les cellules eucaryotes mais également pour les phospholipides de cellules bactériennes. Des dérivés mono- et di-méthyle de la PE sont également des composés communs de lipides microbiens [82]. Parmi les sources naturelles enrichies en AGPI, la PE constitue la classe de phospholipides contenant la plus grande quantité d'AGPI-LC [83]. La PE ayant une structure similaire à la PC, c'est également un PL neutre à pH physiologique.

### *La phosphatidylsérine*

La phosphatidylsérine (PS) contient un groupement sérine estérifié à l'acide phosphatidique (Fig. I.5). La PS est un composé commun et prédominant des membranes des érythrocytes. La PS est généralement exclue du feuillet externe de la membrane plasmique, lorsque la PS est exposée à la surface des cellules, c'est le témoin d'un collapse dans l'asymétrie des lipides et qui peut être à l'origine d'une augmentation de la coagulation du sang et du phénomène de reconnaissance des cellules apoptotiques [84]. Du fait d'une charge unique sur le groupement phosphate, la PS est chargée négativement à pH physiologique.

### *Le phosphatidylinositol*

Le phosphatidylinositol (PI) a un sucre estérifié à l'acide phosphorique (Fig. I.5). Chaque fonction alcool de l'inositol peut être phosphorylée soit de manière individuelle, soit en combinaison afin de produire des seconds messagers lipidiques plus connus sous le nom de phosphoinositides [85]. Ces derniers sont notamment impliqués dans le trafic membranaire et la transduction du signal. De même que pour la PS, le PI est chargé négativement à pH physiologique.

### *Le phosphatidylglycérol*

Le phosphatidylglycérol (PG) a un groupement glycérol estérifié à l'acide phosphorique (Fig. I.5). C'est un des composants principaux des membranes de cellules bactériennes mais il apparaît également dans les membranes animales et végétales à plus faibles concentrations [86]. Tout comme le PI et la PS, le PG est chargé négativement à pH physiologique.

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### 3. Les dérivés de phospholipides

#### *Plasmalogènes*

Les plasmalogènes ou étherphosphoglycérides ont une structure similaire aux acides phosphatidiques à l'exception de l'acide gras en position *sn*-1 du glycérol qui est lié par une liaison vinyl-éther à la place d'une liaison ester (Fig I.6). Le résidu estérifié peut être un résidu éthanamine ou choline. Dans les muscles squelettiques de bovins, d'ovins, de porcins et de poulets, entre 39 et 49% de la fraction totale PE était des plasmalogènes alors qu'elle n'était que de 10 à 30% pour la fraction PC [77]. Les 1-alkenyl-2,3diacylglycérols sont appelés plasmalogènes neutres tandis que les 2-acyl-1-(1-alkenyl)-*sn*-glycérophosphocholine sont appelés plasmalogènes ou plasmenylcholines [2].

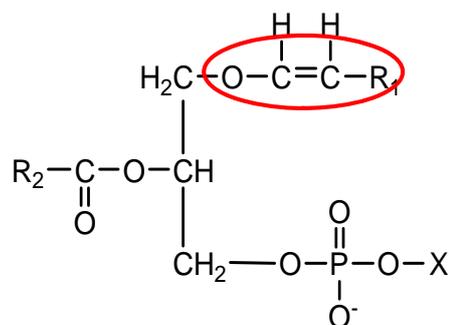


Figure I.6. Structure d'un plasmalogène. Le cercle représente la liaison vinyl-éther en position *sn*-1 du glycérol, d'après [2].

#### *Lyso-phospholipides*

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides. On distingue selon le site d'action de l'enzyme : les phospholipases A1 et A2 qui agissent respectivement au niveau de la position *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol libérant un acide gras libre et un lyso-dérivé de PL appelé lyso-phospholipide ; la phospholipase B libérant les deux acides gras et un glycérophosphorylalcool ; la phospholipase C qui intervient sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate, libérant un diglycéride et un phosphoalcool ; et la phospholipase D qui lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un phosphatidate et un alcool [86].

La lyso-phosphatidylcholine est le lyso-phospholipide majoritaire retrouvé dans les tissus humains mais les quantités sont négligeables. Cette forme de phospholipides peut être

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

considérée comme un vecteur de choix pour vectoriser les AGPI-LC afin qu'il s'accumule dans les organes cibles tels que le cerveau [87]. En effet, le DHA peut être transporté dans le sang sous différentes formes : lié aux lipoprotéines et provenant des TAG ou des PL, ou lié à l'albumine sous forme estérifiée ou non au lyso-PC. De ces différents moyens de vectorisation, il a été montré que le moyen le plus efficace pour franchir la barrière hémato-encéphalique et s'accumuler dans le cerveau était estérifié au lyso-PC [88].

### II. Rôles des phospholipides

#### 1. Constituants majeurs des membranes cellulaires

Les phospholipides ont la capacité de s'auto-assembler en bicouches fluides, structure retrouvée notamment dans les membranes cellulaires. Cette structure permet de répondre aux deux rôles essentiels des membranes cellulaires : établir une barrière avec une perméabilité sélective et servir de matrice pour les protéines membranaires. En effet, les lipides peuvent s'empaqueter selon une configuration précise pour faciliter le fonctionnement de la protéine [86].

La distribution des différentes classes de phospholipides au sein des membranes de cellules mammifères ne se fait pas de manière aléatoire entre les deux feuillets. En effet, les phospholipides contenant un groupement choline (PC et SM) se retrouvent principalement sur le feuillet externe tandis que les amino-phospholipides (PE et PS) sont les composants majeurs du feuillet interne [84].

En plus d'être constituants principaux des membranes biologiques, les phospholipides sont également des participants actifs dans le contrôle de diverses fonctions cellulaires telles que la régulation de l'activité enzymatique et de la transcription, la transduction des signaux et le traitement de l'information, le repliement des protéines, la translocation et le trafic intracellulaire [89].

#### 2. Utilisation des phospholipides en industrie alimentaire

Dans le secteur de l'industrie alimentaire, le terme de lécithine est généralement préféré à celui de phospholipides. Dans la littérature plus ancienne, la lécithine était le nom donné pour qualifier la phosphatidylcholine. Depuis, la lécithine désigne principalement un mélange complexe et naturel de composés obtenus par lavage à l'eau des huiles végétales (soja,

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

tournesol, ou colza) lors des opérations de dégommeage. Les phospholipides sont séparés de l'huile et se retrouvent dans les gommages. Cependant, ce terme est abusif puisqu'environ 75% des composés actifs de ces gommages sont des phospholipides [90]. De nos jours, ce terme est également retrouvé dans la littérature et il caractérise généralement un mélange de phospholipides issus d'une source naturelle.

Le rôle essentiel des phospholipides en industrie alimentaire est lié à leur pouvoir émulsifiant. En effet, grâce à leur caractère amphiphile, les phospholipides ont la capacité de pouvoir diminuer la tension de surface en s'adsorbant aux interfaces dans les émulsions eau/huile [2]. Ainsi, les phospholipides entrent dans la composition des margarines, chocolats, pâtisseries, produits instantanés, produits laitiers, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Dans ce type d'applications, les valeurs nutritionnelles des phospholipides sont négligeables du fait de leur faible proportion dans la formulation des aliments (de 0,3 à 1%). La formation de liposomes de phospholipides dans les dispersions aqueuses permet la solubilisation de composés lipophiles. La disponibilité de certaines substances peut, de cette manière, être accrue (jusqu'à un facteur 13) et ainsi entrer dans la composition de certains produits industriels [91].

### 3. Vecteurs de composés actifs

Les vésicules composées à partir de phospholipides (ou liposomes) ont des temps de vie très courts une fois introduits dans la circulation. L'évacuation rapide du sang est due à leur phagocytose par le système réticulo-endoplasmique du foie et de la bile [22]. En appliquant des principes de stabilité colloïdale, on a pu prolonger leur durée de vie dans l'organisme. L'utilisation de lipides comportant des groupements sucres (tels que les gangliosides) ou ayant été modifiés synthétiquement avec des groupes polyoxyéthylènes permet d'obtenir une stabilisation stérique

## III. Organisation des phospholipides

### 1. Hydratation des phospholipides

Lorsqu'une suspension de phospholipides est dispersée mécaniquement dans une solution aqueuse, ils peuvent s'auto-organiser selon trois différents assemblages : micelle, feuillet de bicouches et liposomes (Fig. I.7). Le type de structure formé dépend des interactions hydrophobes causées par les chaînes d'acides gras qui tendent à s'agréger et exclure les

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

molécules d'eau du « cœur » hydrophobe. Les micelles sont rarement formées par des phospholipides naturels, leur concentration micellaire critique étant très faible (de l'ordre de la mmol/L) en raison des chaînes acyles qui sont trop volumineuses pour intégrer correctement l'intérieur d'une micelle.

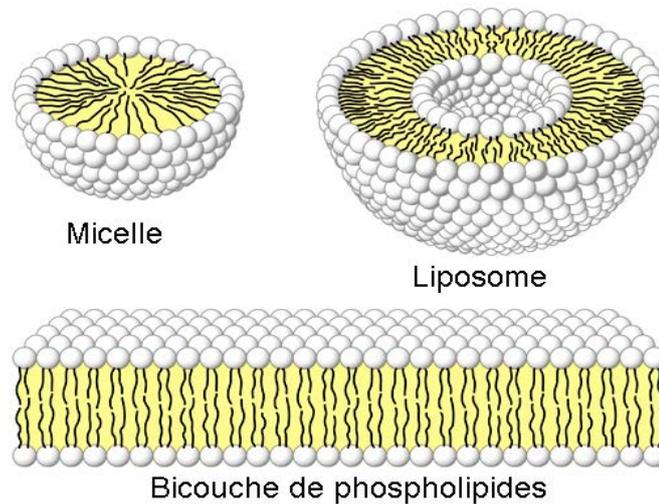


Figure I.7. Représentation schématique des différentes organisations supramoléculaires adoptées par des phospholipides plongés en milieu aqueux

Comme nous l'avons vu précédemment, les phospholipides sont des molécules formées d'une partie hydrophile (tête polaire) et d'une partie hydrophobe (chaînes aliphatiques), on peut donc les qualifier de molécules amphiphiles. C'est la faible solubilité des chaînes acyles dans l'eau combinée à la forte interaction entre les molécules d'eau par un haut réseau tétraédrique de liaisons hydrogènes, qui fournit la force « attractive » qui maintient les phospholipides assemblés en complexes supramoléculaires.

### 2. Polymorphisme des phospholipides

Comme nous l'avons vu précédemment, les molécules amphiphiles ont la propriété unique de s'organiser en structures qui combinent une périodicité à grande échelle dans une, deux ou les trois dimensions, avec un désordre à petite échelle. Luzzati et *al.* ont fourni les premières études structurales de la diversité des phases formées par les composés amphiphiles anhydres ou hydratés [92].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

L'ordre à longue distance est mentionné en lettre capitale, L pour un réseau monodimensionnel lamellaire, H pour un réseau bidimensionnel hexagonal, P pour un réseau bidimensionnel oblique ou centré (ridé) et Q pour un réseau cubique. Les indices I et II sont utilisés pour noter le type de phase, I pour la phase normale (huile dans eau), II pour la phase inverse (eau dans l'huile). Ainsi, la phase hexagonale  $H_I$  est une phase dans laquelle les lipides forment des cylindres avec les têtes polaires orientées vers l'extérieur au contact de l'eau. Les cylindres sont empilés dans un motif hexagonal. La phase hexagonale  $H_{II}$  est également formée de cylindres mais ceux-ci ont la partie hydrophile à l'intérieur. L'intérieur du cylindre recèle donc une colonne d'eau.

Des indices en lettres grecques sont utilisés pour décrire la conformation des chaînes :  $\beta$  pour des chaînes partiellement ordonnées de type gel,  $\alpha$  pour des chaînes désordonnées de type fluide,  $\alpha\beta$  pour une coexistence de chaînes en phase liquide et en phase ordonnée, et  $\delta$  pour une conformation de chaîne structurée en hélice. De plus, l'indice c est fréquemment utilisé pour un arrangement cristallin des chaînes. Une liste des différentes mésophases est donnée dans le Tableau I.4 et leurs représentations schématiques sont visibles en Figures I.8 et I.9

Tableau I.4. Récapitulatif des différentes mésophases [18]

Principales mésophases			
L: Lamellaires - H : Hexagonales - P : Ridées - Q : Cubiques			
	type	phase	structure de la phase
lamellaires "type solide"	3D	$L_c$	cristal 3D
	2D	$P_\beta$	gel ridé
	1D	$L_\beta$	gel droit
		$L_{\beta'}$	gel incliné
phases fluides	3D	Q	cubique
	2D	H (type I et II)	hexagonale
	1D	$L_\alpha$	lamellaire fluide

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

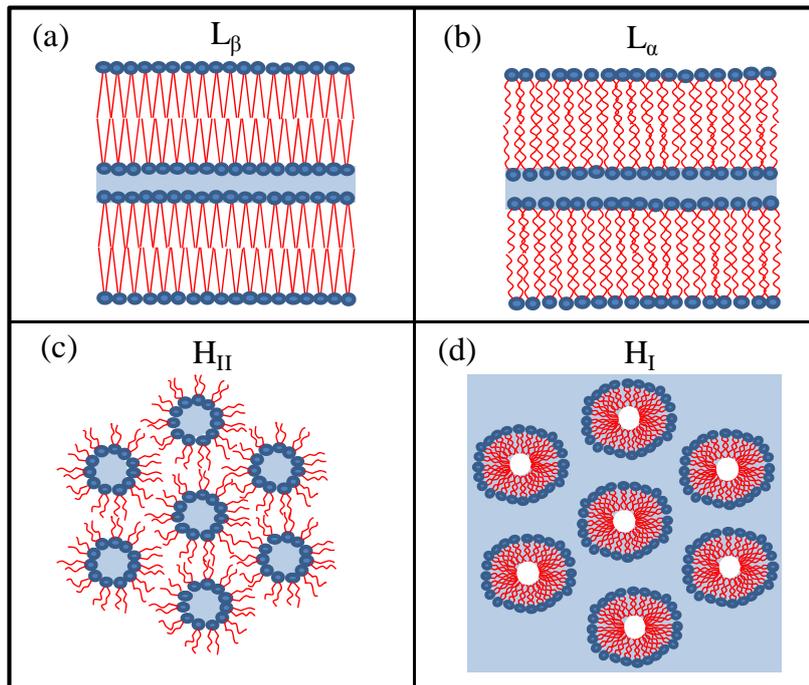


Figure I.8. Représentation schématique des principales phases formées par un mélange eau-phospholipides : (a) phase gel lamellaire, (b) phase lamellaire liquide cristal, (c) et (d) phases hexagonales. Adaptée de la référence [3].

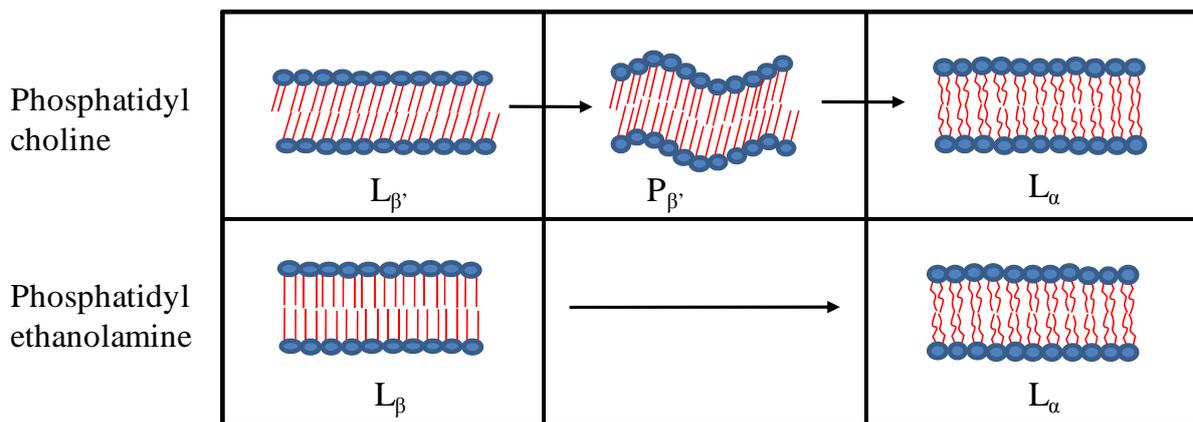


Figure I.9. Schéma des différentes phases lamellaires trouvées pour la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine en fonction de la température:  $L_{\beta}$ , phase gel,  $P_{\beta'}$ , phase gel ridé,  $L_{\alpha}$ , phase cristal liquide. Le sens des flèches indique une augmentation de température. Adaptée de la référence [3].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

La phase lamellaire  $L_{\alpha}$  est la phase que l'on trouve principalement dans les membranes biologiques. Les chaînes acyles sont très désordonnées. La phase lamellaire  $L_{\beta}$  est obtenue après refroidissement des lipides en phase lamellaire. Les molécules sont étroitement empilées et les chaînes acyles sont régulièrement alignées (configuration *all-trans* trouvée dans les cristaux lipidiques) et ne sont pas inclinées par rapport au plan de la bicouche. Comme les chaînes sont étirées au maximum, l'épaisseur de la bicouche en phase  $L_{\beta}$  est supérieure à l'épaisseur en phase  $L_{\alpha}$ . La densité de la phase gel est légèrement supérieure à la densité de la phase cristal-liquide.

Quand les chaînes acyles sont inclinées par rapport au plan de la bicouche, en phase  $L_{\beta'}$ , c'est parce que les têtes polaires sont plus volumineuses par rapport aux queues hydrophobes. Lorsqu'on augmente la température, la phase  $L_{\beta'}$  se transforme en  $P_{\beta'}$  dans laquelle la phase lamellaire est conservée mais la bicouche présente des ondulations périodiques observables en microscopie électronique.

### 3. Diagramme de phase de phospholipides

La longueur de chaîne des acides gras et leur degré de saturation, la température, la composition du milieu aqueux dispersant (pH, force ionique), la structure moléculaire des phospholipides et leur concentration sont des paramètres qui vont déterminer la forme des associations intermoléculaires. Néanmoins, la façon de présenter le comportement de phase des phospholipides la plus pratique, sommaire et représentée dans la littérature reste le diagramme de phase température – composition (T-C). On parle ainsi de polymorphisme thermotropique lorsqu'un changement de température induit un changement de phase, et de polymorphisme lyotropique lorsque c'est la concentration en phospholipides qui intervient. Plusieurs méthodes expérimentales existent pour mesurer la transition entre deux phases d'un phospholipide parmi lesquelles la RMN, la résonance paramagnétique électronique ou la fluorescence. La méthode par analyse thermique différentielle, qui mesure la chaleur absorbée (ou émise) lors d'un processus endothermique (ou exothermique), reste néanmoins la plus répandue. Trois paramètres d'intérêts sont mesurés par cette méthode : l'aire du pic de transition qui est proportionnelle à l'enthalpie de transition, la largeur de la transition qui reflète la cohésion à l'intérieur de l'échantillon (elle renseigne sur le nombre de molécules qui entreprennent une transition simultanément) et la température de transition elle-même [86].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Un grand nombre de travaux ont été menés sur l'étude du comportement de phase de phospholipides comme l'indique les revues de Koynova et ses collaborateurs [81], [93] qui ont regroupé une documentation conséquente sur les températures de transition et diagrammes de phase de PC purs, à chaînes mixtes, ou ayant subi des modifications au niveau de la tête polaire ou des chaînes. Un diagramme de phase typique est présenté en Figure I.10 pour la DPPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine). En fonction de la composition et/ou de la température, ce composé peut entreprendre plusieurs transitions de phase et à certains points du diagramme, il arrive que plusieurs phases coexistent.

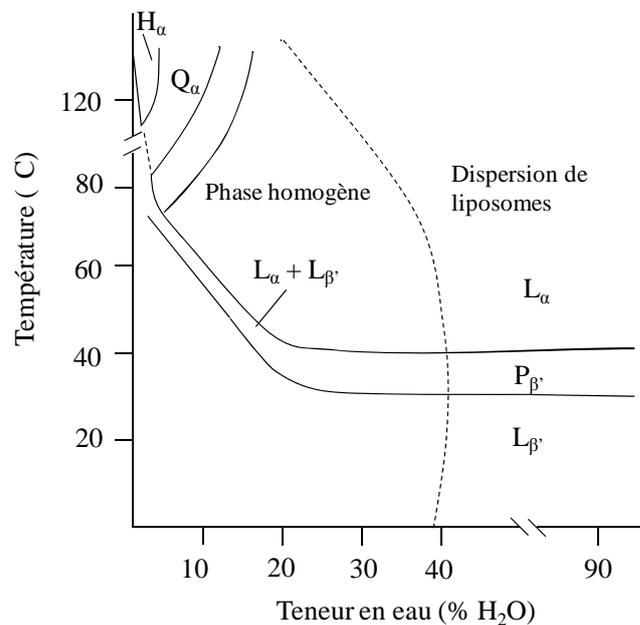


Figure I.10. Diagramme de phase de la DPPC dans l'eau. Sont indiquées la phase lamellaire gel (L<sub>β'</sub>), la phase lamellaire fluide (L<sub>α</sub>) et la phase gel ridé intermédiaire (P<sub>β'</sub>). A haute température et faible hydratation, d'autres phases peuvent se former (la phase cubique Q<sub>α</sub> et la phase hexagonale H<sub>α</sub>). La ligne en pointillés indique la quantité maximale d'eau qui peut être absorbée avant un déphasage. Adapté de la référence [3].

### 4. Thermodynamique du polymorphisme

Dans toutes les structures lipidiques, l'association des parties apolaires entre elles et l'exclusion de ces dernières par les molécules d'eau qui se retrouvent au niveau des têtes polaires sont régies par les liaisons faibles : ce sont elles qui stabilisent la structure. Parmi celles-ci, les interactions hydrophobes jouent un rôle prédominant.

Quand une molécule non polaire est placée dans l'eau, elle modifie la distribution des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau. La molécule hydrophobe provoque la formation d'une cage d'eau (clathrate) autour des têtes polaires. Les molécules d'eau s'orientent de façon à

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

maintenir des liaisons hydrogène intermoléculaires entre-elles mais comme le nombre de molécules d'eau au contact de la molécule hydrophobe est limité cela génère des contraintes importantes. Il en résulte une diminution d'entropie du système plus ordonné. C'est une interaction défavorable. Une deuxième molécule non polaire aura tendance à s'associer avec la première pour s'entourer de la même cage d'eau (plutôt que de faire une deuxième cage). La diminution d'entropie sera moins grande pour une grosse cage que pour deux petites. Cette tendance à l'association des deux molécules hydrophobes est appelée « effet hydrophobe ».

### 5. Auto-assemblage des phospholipides

Le mécanisme de conditionnement des phospholipides peut être déduit en considérant la forme des ces derniers. L'auto-assemblage dépend de la surface occupée au niveau de la tête polaire et du rapport entre celle-ci et la surface occupée par les chaînes carbonées. Quantitativement, cela peut être décrit par :

$$Pr = A_H / A_C \quad \text{Équation 1}$$

où  $A_H$  est l'aire au niveau de la tête polaire,  $A_C$  est l'aire de la région des chaînes carbonées et  $Pr$  est le packing ratio, c'est-à-dire le ratio entre ces deux valeurs permettant de définir les propriétés d'empaquetage. Une bicouche lipidique devrait avoir un  $Pr \approx 1$ , significatif d'une forme cylindrique alors que la surface occupée par la tête polaire serait approximativement identique à celle occupée par la région hydrophobe. Lorsque  $Pr$  est différent de 1, le conditionnement des lipides change donnant naissance à d'autres types de phases telles que les phases hexagonales I ou II, et la phase cubique [3].

## IV. Systèmes modèles de bicouches phospholipidiques

Les propriétés physiques et les rôles fonctionnels de chaque lipide constituant la membrane sont extrêmement difficiles à déterminer dans une membrane biologique intacte du fait de la complexité de la composition lipidique. Afin de mieux comprendre les rôles des différents composants, il est nécessaire de construire des systèmes modèles de membranes qui contiennent chaque lipide d'intérêt.

### 1. Les liposomes

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### *Définition*

Les liposomes sont des vésicules constituées d'un volume interne aqueux entouré d'une membrane phospholipidique. Ils se forment spontanément quand des phospholipides sont dispersés dans un milieu aqueux. Leur dimension est très variable selon la façon dont ils sont préparés. Ainsi, leur diamètre peut aller de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres [94].

### *Les différents types de liposomes*

Il a été montré que dans le cas où l'on a des lipides de forme cylindrique, l'hydratation de films de phospholipides conduit spontanément à la formation de vésicules multilamellaires (MLVs) [80]. A partir de ces MLVs, on peut former par extrusion ou sonication des vésicules unilamellaires dont le diamètre varie de quelques dizaines de nm pour les SUV (Small Unilamellar Vesicles) à quelques centaines de nm pour les LUV (Large Unilamellar Vesicles) et jusqu'à quelques microns pour les GUV (Giant Unilamellar Vesicles). L'intérêt de ces derniers modèles réside dans la présence d'une seule bicouche de lipides séparant le milieu intérieur du milieu extérieur, à l'image de la plupart des cellules. La formulation des vésicules se compose généralement de phospholipides naturels ou synthétiques, avec parfois la présence de cholestérol et plus occasionnellement de lipoprotéines [95].

### *Utilisation des liposomes*

Les liposomes ont d'abord été testés et conçus au début des années 70 comme vecteurs de molécules bioactives afin d'administrer des médicaments ou comme utilisation dans le domaine de la cosmétique [96], [95]. Les vésicules lipidiques influencent grandement la distribution des médicaments et permettent de diminuer les effets secondaires au cours du traitement antibiotique. La stabilité des liposomes, qui peut être divisée en stabilité physique, chimique ou biologique, est l'un des principaux facteurs qui traduit l'efficacité de transport des molécules dans l'organisme.

La capacité des liposomes à piéger des solutés pour lesquels ils sont sélectivement perméables a fait de ces particules un formidable modèle pour reproduire les membranes cellulaires, et a abouti à une prolifération d'études sur la biophysique, la structure et le fonctionnement des membranes cellulaires [8], [97].

## 2. Monocouches à l'interface air-eau

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Lorsqu'une solution contenant une molécule amphiphile dans un solvant hydrophobe est placée à la surface d'une solution aqueuse avec une micro-seringue, la solution se répand rapidement pour couvrir toute la surface disponible. Lorsque le solvant s'évapore, une monocouche se forme. Lorsque la surface disponible est suffisamment grande, la distance entre deux molécules adjacentes est large et les interactions entre elles sont faibles. La monocouche peut donc être considérée comme un gaz en deux dimensions. Sous ces conditions, la monocouche a peu d'effets sur la tension de surface de l'eau.

Si la surface disponible est réduite par le biais de barrières, les molécules commencent à exercer un effet répulsif entre elles. Cet analogue en deux dimensions d'une pression est appelé pression de surface  $\Pi$ , et est donné par la relation suivante :

$$\Pi = \gamma - \gamma_0$$

où  $\gamma_0$  est la tension de surface en l'absence de la monocouche et  $\gamma$  la tension de surface en présence de la monocouche.

### 3. Autres systèmes modèles

#### *Bicouches planes*

Les bicouches planes appelées aussi « black lipid membranes » en anglais constituent le modèle d'intérêt pour étudier l'électrophysiologie du courant circulant à travers une membrane [86]. Ce type de bicouche est formé en déposant des phospholipides dissous dans un solvant organique hydrophobe au niveau d'un orifice formé sur un matériau hydrophobe plongé dans un compartiment aqueux. Le solvant se disperse dans l'eau et une bicouche se forme au niveau de l'orifice séparant ainsi le compartiment aqueux en deux. Les propriétés électriques de la barrière sont directement mesurables en plongeant des électrodes dans les deux compartiments. Il est également possible d'intégrer des protéines membranaires dans le film si celles-ci sont solubles dans le solvant organique.

#### *Les bicelles*

Les bicelles représentent un intermédiaire entre vésicules classiques et les micelles [98]. Ce sont des mélanges de lipides à longues chaînes (entre 12 et 18 atomes de carbone) et des lipides à chaînes courtes (entre 6 et 8 atomes de carbone). L'organisation la plus répandue qui en découle est un nanodisque avec les lipides à chaînes longues présents en majorité dans la partie plane du disque et les lipides à chaînes courtes étant distribués principalement sur les bords du disque, de manière à le cloisonner.

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### **Partie 3 : Influence des AGPI sur les propriétés physiques des membranes**

Puisque les AGPI n-3 et notamment le DHA ont révélé être actifs sur de nombreux systèmes biologiques différents, on peut penser que ces molécules agissent à un niveau fondamental, probablement commun à toutes les cellules. En effet, les AGPI influencent les propriétés physiques des membranes biologiques telles que l'organisation générale de la membrane, la perméabilité aux ions, l'élasticité et la formation de micro-domaines [99]. Dans cette partie, on s'attardera sur les effets du DHA et par extension à d'autres AGPI n-3 sur la structure et l'organisation des membranes.

#### **I. Propriétés structurales**

Un des objectifs principaux de la biophysique des membranes est d'acquérir une base de données regroupant les paramètres physiques des principales bicouches lipidiques dans la phase fluide  $L_{\alpha}$ , la phase correspondant à celle des lipides retrouvés dans les membranes biologiques. Ces paramètres incluent l'aire par lipide et l'épaisseur de la bicouche. Ces derniers sont nécessaires si l'on veut étudier les interactions lipides-protéine ou encore les interactions entre les petites molécules et la bicouche. Ils sont également importants pour tester et orienter la viabilité des systèmes lors des simulations de bicouches lipidiques [100].

Plusieurs approches sont possibles pour obtenir les informations sur la structure des bicouches en phase  $L_{\alpha}$ . La méthode traditionnelle de Luzzati consiste en des mesures gravimétriques par diffraction des rayons X et nécessite de connaître les volumes molaires des lipides mis en jeu ainsi que la quantité d'eau exacte hydratant les bicouches. Cependant, cette méthode manque de précision pour les échantillons proches de l'état saturé en eau puisqu'il peut arriver qu'une certaine quantité d'eau ne s'incorpore pas totalement dans les bicouches pouvant ainsi fausser les résultats [101], [102]. A partir de la diffraction des rayons X, il est également possible d'élaborer le profil de densité électronique des bicouches en phase fluide. La donnée principale obtenue avec le profil de densité électronique est l'épaisseur de la bicouche mais il est également possible d'en dériver la valeur de l'aire par lipide [103]. Enfin, il est également

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

possible de déterminer l'aire par lipide par RMN [104] et par diffraction de neutrons [105]. Cependant, ces différentes méthodes utilisées pour estimer la surface moléculaire peuvent conduire à une grande étendue de valeurs alors que le résultat ne dépend pas du degré de pureté de l'échantillon. Pour le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (DPPC) par exemple, phospholipide synthétisé avec une forte pureté depuis plus de 25 ans, les valeurs de l'aire par lipide s'étendent de 58 à 71 Å<sup>2</sup> [103]. Ce problème se pose également dans les études sur les phospholipides d'origine naturelle comme la PC d'œuf (qui reste le phospholipide naturel le plus étudié) où la diversité de composition entraîne une augmentation du facteur de dispersion des valeurs (Tableau I.5). Il en va de même pour les phospholipides contenant une chaîne DHA, même si peu de résultats expérimentaux sont disponibles dans la littérature, où on retrouve notamment pour le 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (SDPC) une aire de 69,2 Å<sup>2</sup> en multicouches à 30°C à partir d'analyses combinées en rayons X et RMN [101], et une valeur de 65 Å<sup>2</sup> par rayons X en multicouches orientées à 25°C [4].

Tableau I.5. Comparaison des valeurs de la littérature pour différents paramètres structuraux de la PC d'œuf en bicouches fluides.

	[106]	[107]	[10]	[108]
$d$ [Å]	48,1	66,3	64,1	62,0
$d_{\text{HC}}$ [Å]	28,4	36,3	29,6	26,4
$d_{\text{H/H}}$ [Å]	37,7	35,4	-	38,8
$A$ [Å <sup>2</sup> ]	64,8	69,4	71,7	73,1
$\alpha$ [molécules d'eau/lipide]	20	34,7	34,5	33,6
méthode	diffusion de neutrons aux petits angles	diffraction de rayons X	diffraction de rayons X	diffraction de rayons X
système	liposomes unilamellaires	dispersion de multicouches	dispersion de multicouches	multicouches orientées

$d$  : distance de répétition des bicouches ;  $d_{\text{HC}}$  : épaisseur hydrophobe ;  $d_{\text{H/H}}$  : épaisseur de la membrane ;  $A$  : aire par lipide

De ce fait, il devient alors plus pertinent de comparer des valeurs d'aire par lipide déterminée dans des conditions similaires ou de dégager des tendances générales si l'on souhaite comparer différents systèmes. On peut alors examiner l'effet global des chaînes de DHA sur la structure des bicouches. A cet égard, deux questions se posent : (1) comment la densité latérale (et donc l'aire par lipide) est affectée par la présence du DHA ? (2) Quelle est la variation de l'épaisseur de la bicouche ?

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Les premières études sur l'influence des chaînes polyinsaturées ont porté sur les paramètres globaux d'empaquetage des lipides dans les biomembranes. Des mesures en monocouche ont montré que l'introduction d'une double liaison en position *sn*-2 sur la PC augmentait considérablement l'aire occupée par un lipide [109], [110]. Cependant, des ajouts successifs de doubles liaisons mènent seulement à une légère augmentation. En particulier, les monocouches composées d'au moins 3 doubles liaisons *cis* varient peu en aire par lipide.

Des études comparatives sur la structure des bicouches de PC composées d'une chaîne saturée en *sn*-1 et une chaîne insaturée en *sn*-2 ont montré que l'aire par lipide augmentait avec le nombre de doubles liaisons [101], [111], [112]. En effet, la surface moléculaire dépend du volume des chaînes latérales qui composent le phospholipide. Or, le volume de la chaîne de DHA est bien supérieur au volume d'une chaîne saturée comme le montre la Figure I.11. Holte et *al.* ont notamment estimé le volume de plusieurs chaînes par calcul en fonction des volumes respectifs des groupements CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> et ont déterminé une valeur de 516 Å<sup>3</sup> pour la chaîne de DHA et 486 Å<sup>3</sup> pour la chaîne d'acide stéarique en phase cristal-liquide lorsque celles-ci sont situées en position *sn*-2 du glycérol [113]. Du fait d'une augmentation de la surface moléculaire pour les lipides polyinsaturés, en conservant une épaisseur de bicouche constante, la différence est compensée au niveau de la distance hydrophobe qui diminue avec l'augmentation des insaturations des chaînes.

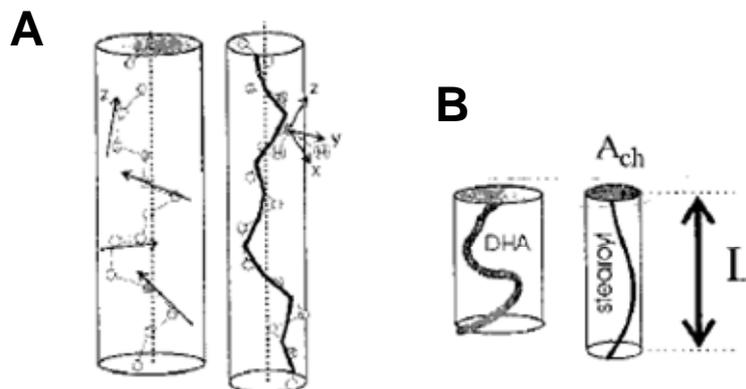


Figure I.11. (A) Représentation schématique des chaînes acyles polyinsaturée (gauche) et saturée (droite) partiellement désordonnée au sein d'une membrane. (B) Volume occupé par les chaînes de DHA et stearoyl, représenté par des cylindres de section  $A_{ch}$  et de longueur  $L$ . Repris de la réf. [4].

### II. Propriétés dynamiques des membranes polyinsaturées

#### 1. Paramètre d'ordre des chaînes acyles

Une partie des propriétés dynamiques des membranes peuvent être déterminées à partir du paramètre d'ordre des chaînes acyles. Ce critère permet d'évaluer l'organisation latérale des lipides. Plusieurs études sur ce point ont été réalisées par  $^2\text{H}$ -RMN sur les membranes contenant au moins une chaîne DHA [114], [113], [111], [12], [115]. Holte et *al.* ont notamment étudié l'influence des insaturations en comparant les lipides avec différents degrés d'insaturation en position *sn-2*, pour une chaîne *sn-1* fixe (18:0) [113]. De cette perspective, ils ont montré que les spectres RMN changeaient nettement en fonction de la nature de la chaîne *sn-2*, et que, par conséquent, le profil du paramètre d'ordre changeait avec une importante perturbation au niveau du milieu de la chaîne caractérisée par une diminution de l'ordre. La présence du DHA influe également sur le comportement de la chaîne saturée en *sn-1* puisqu'il a été démontré que plus le nombre d'insaturations augmente, plus le paramètre d'ordre en position *sn-1* diminue [111], [114], [113]. De même que pour la chaîne *sn-2*, la diminution de l'ordre de la chaîne est plus importante dans la seconde moitié de la chaîne, vers le groupement méthyle terminal. Il ressort de ces résultats que les chaînes AGPI présentent une grande mobilité.

#### 2. Flexibilité

Les premières représentations des AGPI laissaient à penser intuitivement que les chaînes présentent une certaine rigidité due aux multiples doubles liaisons en configuration *cis* qui confèrent peu de degré de liberté pour les liaisons carbone-carbone. En effet, la présence des doubles liaisons enlèverait alors toute possibilité d'isomérisation autour de l'axe de la liaison dans des conditions physiologiques [5]. Depuis, des études de modélisation du DHA ont identifié une série de conformères, dénommés « angle iron » et hélicoïdale (Fig. I.12) qui apparaissaient en forte concentration [5], [116]. Les calculs ont démontré qu'il existait une grande fluctuation dans l'aire moléculaire des chaînes polyinsaturées comparée aux chaînes présentant moins d'insaturations. Bien que les conformations énergétiques minimales correspondent à la conformation de type « épingle à cheveux », les conformations « angle iron » et hélicoïdale ont été jugées plus appropriées pour les conditions biologiques, dans

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

lesquelles le DHA peut être associé à une chaîne saturée comme dans les membranes biologiques typiques.

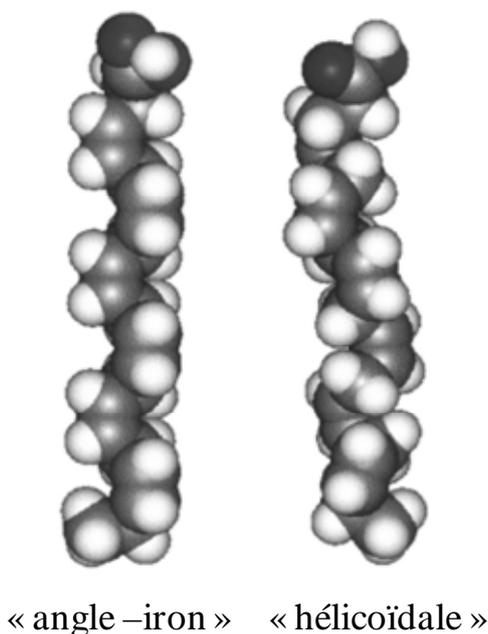


Figure I.12. Représentation des conformations de plus basse énergie pour la molécule DHA déterminées par Applegate et Glomset [5] dans lesquelles les doubles liaisons sont projetées vers l'extérieur de l'axe méthylène dans deux plans quasi perpendiculaires.

Depuis l'étude d'Applegate et Glomset en 1986, plusieurs revues se sont axées sur la structure atomique détaillée et la dynamique des chaînes acyles DHA à partir de résultats de simulation informatique [117], [69], [118]. On retrouve notamment des études en mécanique quantique à partir d'une simplification de la molécule de DHA par le motif répétitif dans la chaîne à savoir le 2,5-heptadiène en le comparant à un alcane (motif représentatif de la chaîne saturée). Tout d'abord, ils diffèrent dans la nature de leurs surfaces d'énergie potentielle pour la rotation autour de l'angle dièdre avec le diène présentant deux minimums énergétiques à  $\pm 120^\circ$  là où l'alcane présente les trois minima usuels à  $\pm 60^\circ$  et  $180^\circ$  (Fig. I.13). De plus, les largeurs des minima sont beaucoup plus étroites pour l'alcane ce qui indique que, pour une certaine quantité d'énergie thermique donnée, le degré de liberté de rotation de la chaîne d'AGPI est plus grand que pour une chaîne saturée. Enfin, bien que les conformations hélicoïdales et « angle-iron » représentent certains minima statiques énergétiques, elles renseignent peu sur la vraie structure des AGPI dans un environnement dynamique qu'est la matrice en phase cristal-liquide. Or, la Figure I.13 démontre que la barrière d'isomérisation pour le diène représente approximativement un tiers de celle du butane. Comme le taux

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

d'isomérisation dépend exponentiellement de la barrière énergétique, les isomérisations pour la chaîne insaturée vont être très rapides comparées aux chaînes saturées.

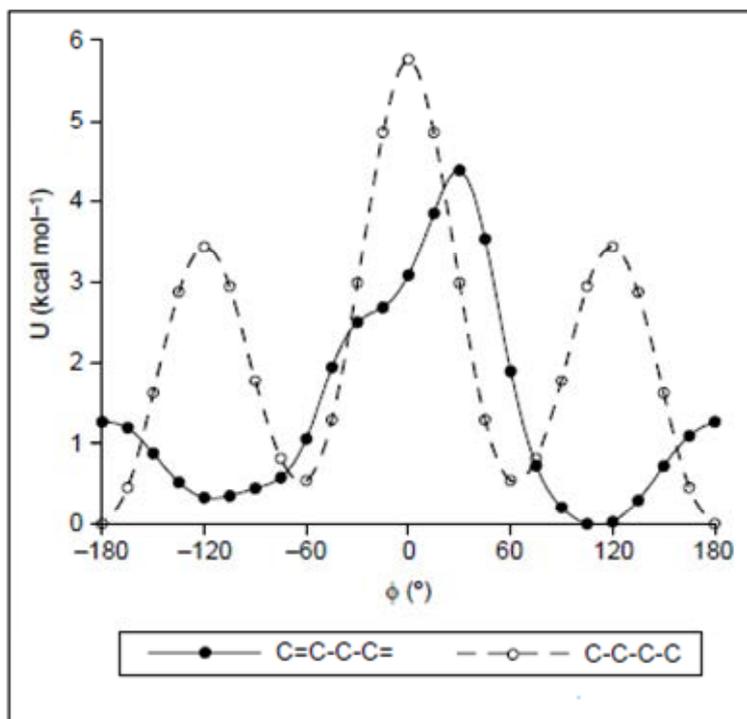


Figure I.13. Surface d'énergie de rotation autour de la liaison simple entre les unités voisines des méthylènes (trait plein) et butane (trait haché) décrit par [6].

En conclusion d'une étude sur des calculs en mécanique quantique de l'énergie de rotation des liaisons vinyle-méthylène, Feller et *al.* ont démontré que la présence des doubles liaisons dans une chaîne carbonée augmentait de manière intrinsèque la quantité d'espace conformationnel accessible autour du groupe central méthylène comparé aux chaînes saturées [6]. Lorsque ces données sont incorporées dans une fonction empirique d'énergie (pour une utilisation ultérieure en simulation de dynamique moléculaire), il en résulte une membrane extrêmement désordonnée avec des interconversions très rapides parmi les différents conformères.

### 3. Elasticité et compressibilité

Les propriétés mécaniques des bicouches lipidiques telles que la viscoélasticité et la compressibilité confèrent à la membrane des cellules leur forme en complémentarité avec le cytosquelette. De plus, durant les changements de conformation des protéines membranaires, les propriétés physiques de la membrane changent également. Cela entraîne une forte anisotropie au sein des propriétés viscoélastiques de la membrane et nécessite une approche

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

des propriétés de la bicouche par le biais de divers modules : modules élastiques  $E$  et modules de compressibilité  $K$  [119].

Des études sur les propriétés d’empaquetage et la viscoélasticité de bicouches composées de phospholipides à chaînes mixtes avec un nombre d’insaturations variable ont montré une plus grande flexibilité des bicouches polyinsaturées permettant des fluctuations de courbure et de surface plus importantes [120], [115]. Bruno et *al.* ont trouvé que la présence du DHA dans des bicouches entraînait une diminution de la rigidité de la membrane caractérisé par une diminution du module élastique. Ces résultats confortent l’idée d’un mécanisme général permettant de moduler la fonctionnalité de la gramicidine (protéine membranaire) [70].

Lors de la compression latérale des bicouches de phospholipides à chaînes mixtes sous l’effet d’un stress osmotique, 75% de la réduction de l’aire latérale de la membrane est causée par la contraction des chaînes polyinsaturées, suggérant une modification dans les propriétés élastiques de la membrane [101], [121].

Les isothermes de pression – surface moléculaire permettent de déterminer le module latéral de compressibilité  $K$ . Il a été montré par une étude systématique de l’influence des insaturations que celui-ci dépend fortement de la composition des chaînes puisque que les monocouches sont plus compressibles (module plus faible) lorsque le nombre d’insaturations augmente [109].

### III. Fluidité de la membrane

#### 1. Transition de phase

Bien que les chaînes insaturées soient importantes pour maintenir un environnement fluide essentiel pour le fonctionnement des protéines membranaires, les chaînes polyinsaturées ne sont pas essentielles pour obtenir un état fluide. En effet, l’introduction d’une première double liaison *cis* dans des bicouches PC a pour effet de diminuer la température de transition de la phase gel à la phase cristal-liquide,  $T_m$ , d’un ordre de 60°C [7], [122] alors qu’une réduction supplémentaire d’environ 20°C accompagne généralement l’introduction d’une deuxième double liaison. Au-delà de deux doubles liaisons, la différence dans les températures de transition de phase est sensiblement plus faible. La Figure I.14 représente l’évolution de  $T_m$  en fonction du nombre de doubles liaisons pour des bicouches de PC ayant des chaînes acyles identiques ou un acide stéarique en position *sn-1* et une chaîne insaturée contenant de 0 à 6 (DHA) doubles liaisons en position *sn-2*. Le comportement est similaire pour les deux types

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

de bicouches bien que les températures de transition des PC homo-acides contenant des chaînes polyènes identiques soient largement plus basses que les PC hétéro-acides saturés-polyinsaturés.

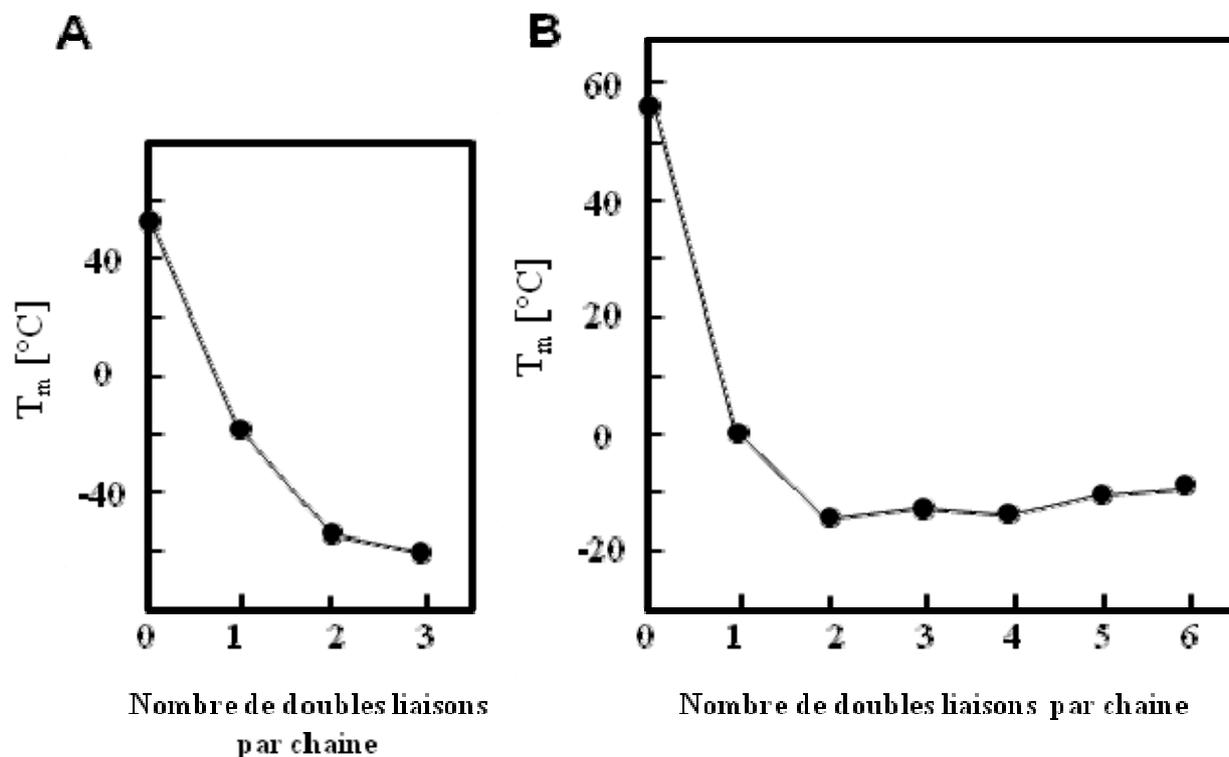


Figure I.14. Dépendance de  $T_m$  en fonction du nombre de doubles liaisons *cis* par chaîne dans des bicouches PC saturées en eau (A) homo-acides à 18 atomes de carbone; (B) hétéro-acides composés d'une chaîne 18:0 en *sn*-1 et contenant jusqu'à 6 doubles liaisons en *sn*-2. Les valeurs ont été reprises d'après [7].

### 2. Mouvement des lipides

La fluidité d'une membrane est liée à certaines caractéristiques des phospholipides telles que la translation latérale et la diffusion. Elle reflète ainsi la capacité des phospholipides à pouvoir se mouvoir au sein de la membrane. En phase lamellaire, les phospholipides dans les systèmes membranaires sont animés de mouvements de translation dans le plan de la membrane et de mouvements rotationnels rapides selon un axe privilégié, appelé normale à la bicouche. Cette orientation privilégiée est à l'origine de l'anisotropie membranaire, c'est-à-dire que les propriétés physiques des phospholipides diffèrent dans toutes les directions de l'espace. La fluidité membranaire n'est donc pas un paramètre directement mesurable à défaut de la réorganisation spatiale et temporelle de la membrane par des techniques micro-spectroscopiques telles que la spectroscopie de corrélation de fluorescence et la spectroscopie

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

de fluorescence résolue en temps [123]. En raison de cette anisotropie des mouvements moléculaires, les valeurs de polarisation de fluorescence déterminées lors de mesures à l'état d'équilibre de sondes fluorescentes extrinsèques incorporées dans des membranes dépendent à la fois de la vitesse du mouvement de la sonde et de son degré d'ordre qui sont tous deux combinés dans la notion de fluidité [56].

Les insaturations influencent fortement les propriétés dynamiques des membranes. Salem et *al.* [124] ont introduit du cholestane marqué dans des fractions de PS provenant de lipides neuronaux enrichis en DHA et trouvèrent que les insaturations diminuaient l'ordre dans la région hydrocarbonée. D'autres études approfondies ont été menées avec des marqueurs fluorescents. Stubs et *al.* [125] ont réalisé des mesures de spectroscopie en temps résolu avec du 1,6 -diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) comme sonde fluorescente sur une série de phospholipides polyinsaturés à chaînes mixtes. Les résultats ont montré que les insaturations augmentaient la vitesse de mouvement des phospholipides comparé à un phospholipide saturé (DPPC) mais que c'est l'introduction de la première double liaison qui marquait cette différence de manière la plus significative.

### IV. Formation de domaines au sein de la membrane

Il est important de noter que le concept standard des membranes proposé par Singer et Nicholson en 1972 [126, 127], dans lequel les lipides s'organisent en bicouches planes suivant le modèle d'une mosaïque fluide et homogène et où les différentes protéines sont incorporées, a été développé depuis quelques années. Les membranes sont actuellement décrites comme un assemblage de régions hétérogènes avec des épaisseurs variables et intégrant beaucoup plus de protéines [128]. La membrane est constituée ainsi par des régions de fonctions et de structures différentes. Ces régions (micro-domaines) sont généralement riches en cholestérol et sphingolipides [129], [130], [131-134], ce qui résulte en des régions plus compactes et plus épaisses (dimension latérale de 4 à 700 nm) caractérisées par un plus grand ordre des chaînes aliphatiques que dans la membrane environnante [55], [135]. Ces régions appelées rafts, jouent de nombreux rôles dans les processus cellulaires comme la fusion de la membrane, la transduction des signaux, etc.... Pour plus de détails sur les membranes rafts voir les références [130], [55], [136].

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

La membrane est donc un ensemble très complexe, dont la composition est très variable d'une espèce à l'autre, d'un feuillet à l'autre dans une même bicouche, mais aussi d'une région à l'autre dans un même feuillet.

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

### Partie 1 : Méthodes expérimentales utilisées

#### I. Méthodes d'extraction et de purification

Il existe plusieurs « chemins » possibles de l'extraction de lipides à partir d'une matrice naturelle jusqu'à la purification d'un composé unique. Le Tableau 1 répertorie quelques unes des méthodes les plus couramment citées dans la littérature permettant d'extraire les lipides, de séparer les lipides neutres des lipides polaires et de purifier un type de phospholipide à partir d'un mélange de lipides polaires. Il y présente également certains avantages et inconvénients liés à chaque méthode. Outre les moyens dont nous disposons, le choix d'une méthode d'extraction et de purification dépend essentiellement de l'application qui en suit.



## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Tableau II.1. Récapitulatif de quelques méthodes d'extraction et de purification des lipides, de l'extraction des lipides totaux à la récupération des différentes classes de phospholipides

opération	méthode	avantage	inconvénient	réf.
1) extraction des lipides	extraction au solvant utilisant un mélange de solvants polaires et apolaires (chloroforme, méthanol, éthanol)	extraction à froid, séparation de grandes quantités d'échantillon, permet l'extraction de composés polaires et apolaires	utilisation de grandes quantités de solvant, temps d'extraction longs pour atteindre de bons rendements	[137] [138]
	extraction au solvant à chaud utilisant un appareil de Soxhlet	extraction semi ou entièrement automatisée, faible consommation de solvant car procédé de distillation du solvant en continu	faible extraction des lipides polaires, temps de procédés longs, limitation des quantités à extraire du à la taille de l'équipement, risques liés à l'ébullition du solvant et possibilité de dégradation de certains composés	[139]
	extraction au solvant sous pression	procédé accéléré	utilisation de solvant, augmentation de l'efficacité avec une augmentation de température	[140]
	SFE : extraction au fluide supercritique (CO <sub>2</sub> )	alternative aux méthodes employant des solvants organiques	coût de l'appareillage	[141]
2) séparation des lipides polaires/lipides neutres	fractionnement au solvant : précipitation des lipides polaires par l'acétone	extraction à froid, facilité de la mise en œuvre	utilisation de solvant, méthode longue et non automatisée	[142]
	chromatographie en fluide supercritique (SFC)	pas de solvant organique utilisé, grande efficacité, méthode rapide	débit limité, nettoyage de l'appareil	[143]
	chromatographie sur colonne en gel de silice	facilité de la mise en œuvre, choix des fractions à séparer en fonction des solvants utilisés	pureté des fractions obtenues, pertes de produits dans la colonne, grandes quantités de solvant	[144] [145]

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

	chromatographie sur couche mince (CCM)	facilité de la mise en œuvre, faible coût, rapidité	faible sensibilité, risque d'oxydation, pertes sur la plaque, utilisée principalement pour l'analyse qualitative	[146]
	HPLC préparative et détection UV, par diffraction de la lumière ou par indice de réfraction	vitesse, précision, haute sensibilité, diminue les risques d'oxydation, forte reproductibilité	coût, volume des quantités injectées	[147] [148]
	chromatographie sur colonne en gel silice à basse pression	facilité de la mise en œuvre, choix des fractions à séparer en fonction des solvants utilisés	pureté des fractions obtenues, pertes de produits dans la colonne due à l'adsorption sur silice, grandes quantités de solvant	[149]
3) séparation des différentes classes de phospholipides	SFC couplée à une détection par spectroscopie de masse et diffraction de la lumière	pas de solvant utilisé, grande efficacité, méthode rapide	coût, faibles quantités séparées	[150]
	CCM préparative à une ou deux dimensions : migration des PL déposés sur une plaque en gel de silice	facilité de la mise en œuvre, faible coût	utilisation de solvants organiques, pertes de produit dans la silice, méthode longue, faible précision	[146] [151]
	HPLC préparative : détection UV, par diffraction de la lumière ou indice de réfraction	vitesse, précision, haute sensibilité, diminue les risques d'oxydation, forte reproductibilité	coût, volume des quantités injectées	[152]

### II. Structure de la bicouche par diffraction des rayons X

#### 1. Bases théoriques

L'étude de la matière condensée au niveau atomique et moléculaire s'appuie souvent sur les résultats de l'interaction de celle-ci avec des particules (neutrons) ou un rayonnement électromagnétique (rayons X). La diffusion de neutrons ou de rayons X sont des techniques largement utilisées en biologie structurale depuis de nombreuses années. Pour plus de détails, le lecteur est invité à s'orienter vers une revue récente de Kucerka (2007) [97] qui recoupe les dernières avancées réalisées dans le domaine de la diffraction et la diffusion de neutrons et rayons X pour l'étude structurale des liposomes.

#### *Interaction des rayons X avec la matière*

Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques de même nature que la lumière visible, les UV ou l'infrarouge et la seule chose qui les distingue entre eux est leur longueur d'onde. Les rayons X interagissent avec la matière à travers le nuage électronique de chaque atome, qui bouge à des vitesses bien plus faibles que celle de la lumière. Lorsque le rayonnement électromagnétique (les rayons X) atteint une particule chargée (un électron), il devient alors une source secondaire de rayonnement électromagnétique qui est transmis (ou diffusé) par rapport au rayon incident selon un angle de déviation  $2\theta$ . Les détecteurs de fluctuation de la densité se font sur une échelle de distance  $d$ , selon la loi de Bragg [8] :

$$\lambda = 2d \sin\theta \quad \text{Équation 2}$$

Si l'on tient compte des longueurs d'onde disponibles expérimentalement (de 0,5 à 2,5 Å), les angles diffusés  $2\theta$  correspondants sont alors compris entre 0,01 et 180°. L'utilisation des rayons X pour explorer l'organisation structurale de la matière est également encouragée par le fait que c'est une technique non destructive pour l'échantillon, leur degré élevé de pénétration à l'intérieur de la matrice permet la détermination de caractéristiques précises, la sensibilité vis-à-vis de faibles changements structuraux est grande avec un potentiel d'application conséquent.

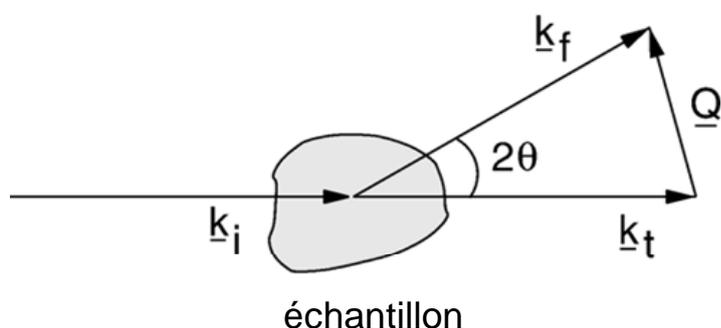


Figure II.1. Représentation schématique du principe général de diffusion ;  $\vec{k}_i$  représente le rayon incident,  $\vec{k}_f$  le rayon diffusé et  $\vec{k}_t$  le rayon transmis, d'après [8].

La validité de la loi de Bragg (équation 1) se limite aux cas à la diffusion élastique c'est-à-dire lorsque l'énergie des rayons X reste constante lors de la diffraction des rayons X (où  $E = hc/\lambda$ ) :  $|\vec{k}_i| = |\vec{k}_f|$  (voir Fig. II.1).

La diffusion peut être avec ou sans perte d'énergie, on parle alors de diffusion élastique ou inélastique (à l'origine de l'effet Compton) respectivement. Les radiations électromagnétiques telles que les rayons X peuvent ainsi interagir de manière différente avec la matière et donner lieu à une multitude de phénomènes tels que la réflexion, la réfraction, la diffusion, la diffraction, la polarisation...

### *Quelques applications*

La diffraction des rayons X est utilisée principalement pour définir la structure des bicouches d'après les valeurs de distance de Bragg appelée également distance de répétition qui correspond à l'épaisseur d'une bicouche et du film d'eau qui lui est associé. À partir de cette valeur et en connaissant au préalable l'hydratation exacte des bicouches, il devient possible de déterminer la surface moléculaire moyenne des lipides en utilisant la méthode de Luzzati [103].

D'autres données peuvent cependant découler de l'étude de la diffraction des rayons X, aux petits ou aux grands angles. En effet, du fait de la périodicité présente dans les multicouches de lipides dans la direction de la normale aux bicouches, la méthode de diffusion des rayons X

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

peut être utilisée pour déterminer la distribution de la densité. La contribution des atomes est associée à la densité des particules diffuses [12]. Ainsi, certaines distances caractéristiques telles que la distance entre les têtes polaires ou la distance hydrophobe peuvent directement être mesurées d'après le profil de densité électronique.

Les mesures s'effectuent en général à partir d'échantillons multilamellaires retrouvés sous forme de larges objets sphériques (type vésicules multilamellaires) ou d'un empilement de bicouches planes alignées. Ces deux types de structure présentent le même type de réponse, lorsqu'elles sont exposées à la diffraction de rayons X puisque les seuls effets qui peuvent être attribués au substrat sont limités aux premières bicouches uniquement. Cependant, bien que les multicouches alignées soient faciles à élaborer, il reste délicat de pouvoir les hydrater de manière complète à partir de vapeur d'eau [153]. Ainsi, il peut s'avérer difficile d'obtenir des résultats constants lorsque les bicouches sont à l'état saturé en eau en mesurant le taux d'hydratation par méthode gravimétrique classique.

### 2. Aspects expérimentaux

En fonction du type d'appareillage, deux techniques pour la diffusion élastiques sont à distinguer : la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, pour small angles X-ray scattering) et la diffraction de rayons X aux grands angles. La seule différence entre ces deux méthodes est le domaine de diffusion des angles  $2\theta$ . Pour la diffraction aux grands angles, la distance entre l'échantillon et le détecteur est plus courte que pour les SAXS ce qui fait qu'ils couvrent une gamme d'angles de 5 à 180° alors que la gamme est de 0,01 à 3° pour les SAXS.

## III. Etude des phospholipides en monocouche

### 1. Principe

L'indicateur le plus important pour les propriétés d'une monocouche d'un composé amphiphile est donné par la mesure de la pression de surface en fonction de la surface d'eau disponible pour chaque molécule. Cette mesure est réalisée à température constante et est ainsi appelée isotherme de pression de surface – surface ou tout simplement isotherme de compression. L'isotherme de compression est réalisée par la compression du film en réduisant la surface entre des barrières à une vitesse constante tout en mesurant parallèlement la pression de surface. En fonction du composé étudié, des cycles répétés de

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

compression/expansion peuvent être nécessaires afin d'obtenir des résultats répétables. Une représentation schématique d'isotherme de compression  $\pi$ -A est présentée en Fig. II.2.

En observant l'isotherme de compression, certaines régions apparaissent clairement, ces régions sont appelées phases [22]. Comme on peut l'observer, lorsque la monocouche subit une compression, elle passe par différentes phases qui sont marquées par des changements de pente dans l'isotherme : lorsque la surface par molécule est la plus large, la monocouche est à l'état « gazeux », G. Elle entreprend une ou plusieurs transitions de phase avant d'atteindre l'état « liquide », L. La phase liquide peut être étendue (LE) puis après une compression plus poussée condensée (LC). La nature de la structure diffère selon la phase LE ou LC, la phase étendue présentant plus de conformations « gauche » pour les liaisons C-C le long des chaînes alkyles [154]. Pour les densités les plus hautes, la monocouche est dite en phase « solide », S. Si la compression est poussée au-delà de l'état solide, la monocouche collapse en structures tridimensionnelles. Le collapse est généralement observé par une diminution rapide de la pression de surface ou par un plateau dans l'isotherme de compression si la monocouche est à l'état liquide.

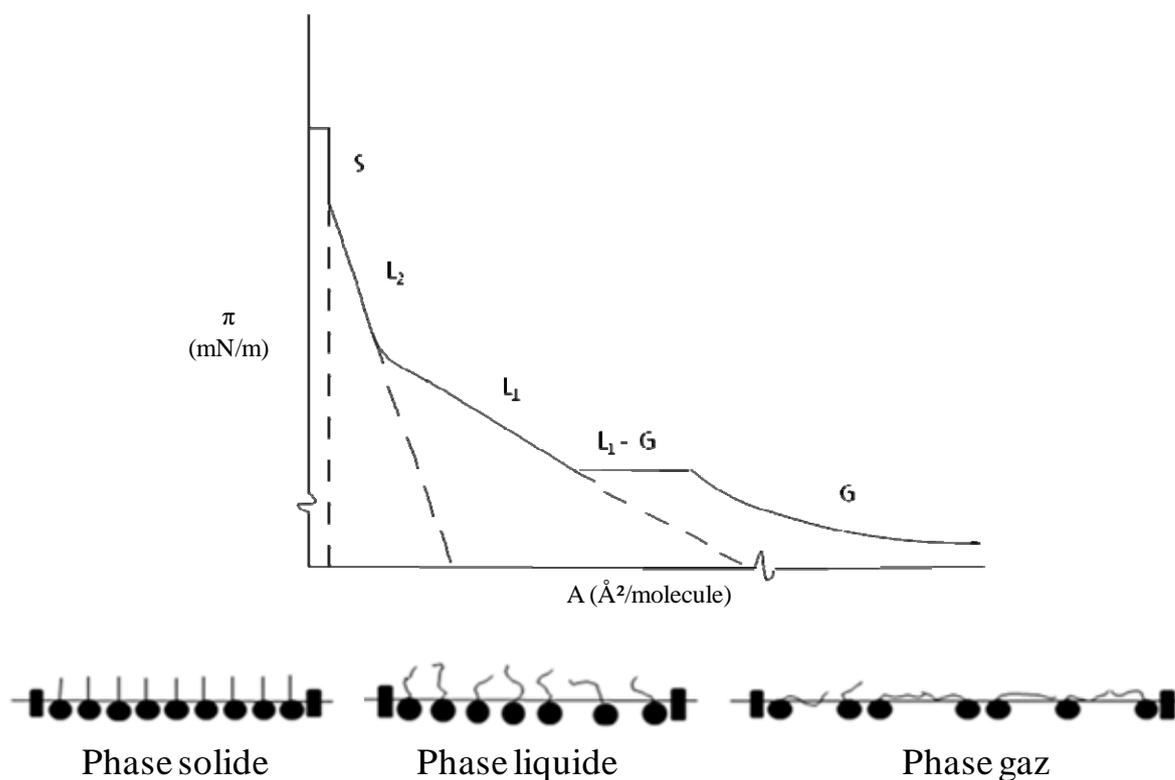


Figure II.2. (Haut) Représentation schématique d'une isotherme de compression  $\pi$ -A. (Bas) Orientation des molécules amphiphiles lors des différentes phases.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

### 2. Instrumentation

La Fig. II.3 présente une représentation schématique d'une balance de Langmuir thermostatée. Les barrières amovibles permettent de réduire la surface disponible en glissant le long de la cuve. La pression de surface ainsi que la surface sont enregistrées continuellement lors de la mesure de compression. La pression de surface est mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy. Dans cette méthode, la mesure est déterminée par la force due à la tension de surface d'une lame suspendue et partiellement immergée dans la phase aqueuse. Cette force est ensuite convertie en tension de surface en connaissant les dimensions de la lame. Les forces agissant sur la lame sont composées de la gravité et de la tension de surface vers le bas, et la flottabilité due au déplacement des molécules d'eau vers le haut.

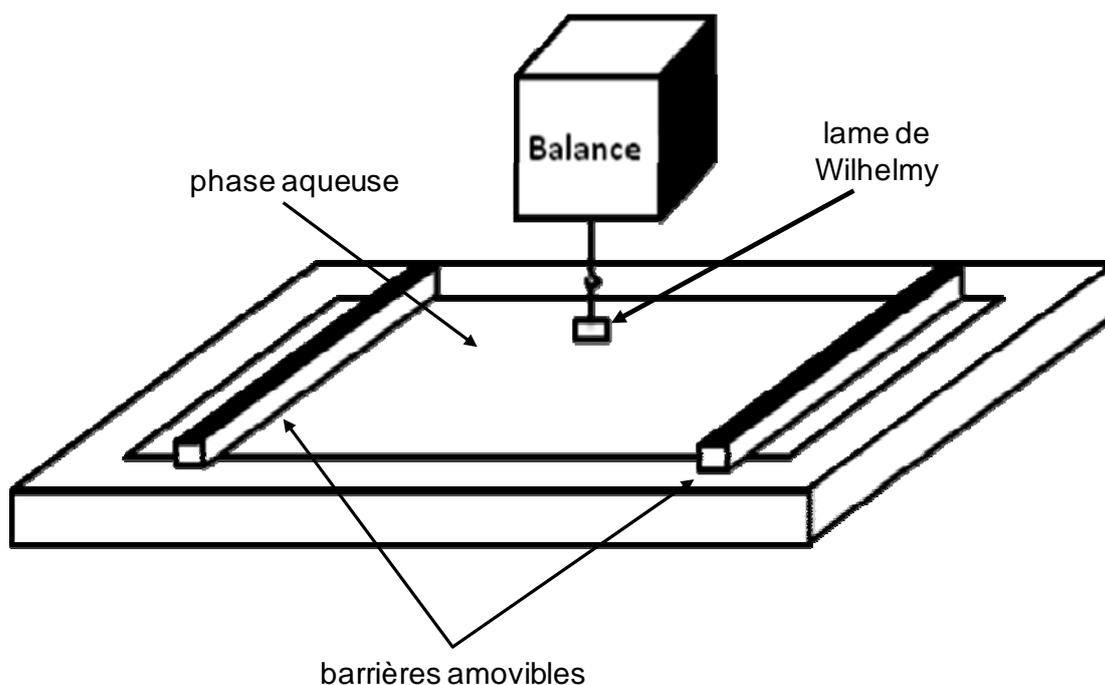


Figure II.3 : Illustration schématique d'une balance de Langmuir avec une lame de Wilhelmy mesurant la pression de surface.

### 3. Expérimentation

Lors d'une mesure standard, la molécule amphiphile naturellement insoluble en milieu aqueux, est déposée sur la surface aqueuse via une solubilisation dans un solvant (généralement du chloroforme), de manière à disperser la molécule amphiphile à la surface.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Une fois que le solvant s'est évaporé, un film monomoléculaire se forme. Il va être par la suite compressé et étendu à l'aide des barrières.

### IV. Caractéristiques du processus d'hydratation

#### 1. Intérêt et applications

L'étude de l'hydratation des phospholipides à l'interface membrane/eau joue un rôle important dans la compréhension de la perméabilité membranaire. On sait depuis longtemps que l'eau située aux interfaces peut avoir différentes propriétés physiques comparé à l'eau dite « libre », c'est-à-dire l'eau en solution. Par exemple, cette eau peut congeler à des températures bien inférieures à 0°C [155]. Les propriétés électriques et la densité de cette eau liée peuvent également être différentes comparées à celles de l'eau environnante ou eau libre.

#### 2. Méthodes expérimentales

Il existe plusieurs approches expérimentales permettant l'étude de l'hydratation des lipides. Parmi elles, on compte les méthodes gravimétriques, électriques, la diffraction de rayons X, la mesure des forces et la RMN (voir la revue détaillée de Jendrasiak [155] pour la présentation et discussion de ces méthodes). Dans notre étude, nous avons opté pour une approche gravimétrique avec la mesure de la quantité d'eau adsorbée en fonction du temps en augmentant progressivement l'humidité relative environnante.

### **Partie 2 : Protocoles expérimentaux**

#### I. Extraction et purification de la phosphatidylcholine

##### 1. Extraction des lipides par la méthode de Folch et *al.* (1957)

La matière première utilisée est un complexe lipoprotéique obtenu après hydrolyse enzymatique de tête de saumon. La phase lourde récupérée au niveau des culots de centrifugation est lyophilisée et conservée sous azote à -18°C jusqu'à extraction de la matière grasse par la méthode de Folch et *al.* [137]. Cette méthode fait appel à une extraction des lipides par un solvant organique, le chloroforme, en présence d'un alcool, le méthanol, qui dissocie les interactions des lipides avec les autres constituants membranaires. Environ 50g de culots de centrifugation lyophilisés sont mélangés avec 200 mL chloroforme et 100 mL méthanol dans un bécher pendant 10 minutes et sous flux d'azote. Le mélange est filtré ensuite sous aspiration sur un verre fritté n°3. On ajoute environ 400 mL de mélange de solvant chloroforme/méthanol 2/1 (v/v) sur le résidu pour assurer l'extraction de la totalité des lipides. Le filtrat est transféré dans un ballon taré puis le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 50°C pour obtenir la masse de lipides. La quantité de lipides est exprimée en pourcentage (%) de la matière lyophilisée et le mélange est appelé lipides totaux (LT).

##### 2. Fractionnement préliminaire des lipides par chromatographie sur colonne

Les LT sont constitués d'un mélange de lipides ayant des propriétés de solubilisation différentes suivant la nature du solvant. Il devient alors possible de séparer les différentes classes de lipides (lipides polaires et lipides neutres) selon leur solubilisation dans les solvants, polaires ou apolaires, sur une colonne d'acide silicique.

La colonne (longueur : 38 cm, diamètre interne : 2,5 cm), garnie d'un filtre en verre fritté, est remplie avec 30 g de gel de silice préalablement activée à 103°C pendant une demi-heure et mélangée à 200 mL d'un mélange hexane/éther diéthylique 80/20 (v/v). L'échantillon de LT (environ 3g) est dissout dans 5 mL de solvant (chloroforme/méthanol 2/1 (v/v)) puis est déposé à l'aide d'une pipette Pasteur le long de la paroi en verre. Les lipides neutres (LN)

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

sont élués par ajout de 200 mL du mélange hexane/éther diéthylique et sont récupérés sous vide dans un ballon préalablement taré. Les glycolipides (GL) sont récupérés de la même manière par ajout de 200 mL d'acétone. Enfin, les phospholipides (PL) peuvent être élués en une seule fraction après ajout de méthanol pur ou séparés par classes de phospholipides par ajout de fractions successives de 100 mL d'un mélange présentant un gradient de chloroforme avec des proportions croissantes en méthanol, suivant la méthode décrite ci-après.

### 3. Purification de la fraction phosphatidylcholine

La purification de la PC a été réalisée par trois approches utilisant des techniques de séparation par chromatographie : la chromatographie sur colonne, l'HPLC et la chromatographie sur couche mince. Chaque méthode présente ses avantages et ses inconvénients. Les trois méthodes ont été testées et au vue des résultats, il a été décidé de procéder à une purification par chromatographie sur colonne. Les trois méthodes sont néanmoins présentées en détail.

#### *Par chromatographie sur couche mince (CCM) semi-préparative*

Les lipides polaires (200mg), préalablement dissous dans un mélange chloroforme /méthanol (2/1 vol/vol), sont déposés sous flux d'azote sur des plaques de silice (dimension 20x20 cm ; épaisseur 2 mm ; Merck Allemagne).

Les PL sont déposés sur une ligne de base à l'aide d'une micro-seringue, sous un flux d'azote pour prévenir de l'oxydation. La migration s'effectue dans un mélange de solvants polaires (chloroforme/méthanol/ammoniaque 65/35/5 v/v). La révélation des différentes fractions se fait par vaporisation d'une solution éthanolique contenant 0,5% de 2,7 dichlorofluorescéine et mise sous lumière UV (270 nm). Les différentes bandes sont grattées et redissoutes dans un mélange chloroforme/méthanol 2/1 v/v. Plusieurs étapes de centrifugation successives sont nécessaires (5 minutes à 2000 g) afin de séparer la silice des lipides et récupérer ces derniers dans la phase organique.

#### *Par chromatographie sur colonne basse pression*

Une fois les fractions LN et GL éluées, la séparation des PL donne lieu à trois fractions : la première fraction est obtenue par passage successif d'un mélange de chloroforme dont les proportions en méthanol sont croissantes : 3/1, 2/1, 3/2 et 1/1 v/v avec 100 mL de chaque mélange. Cette première fraction permet ainsi l'éluion de la totalité de la phosphatidyléthanolamine (PE) et d'une partie du phosphatidylinositol (PI). La deuxième fraction est récupérée avec 200 mL d'un mélange chloroforme/méthanol 1/2 v/v. Cette

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

fraction contient une grande partie de la PC ainsi que de la sphingomyéline (SM) et du PI. Enfin, la dernière fraction est obtenue par élution de 200 mL de méthanol pur. Cette dernière fraction contient la majeure partie de la PC ainsi que du PI et de la SM.

### *Par HPLC semi-préparative*

La séparation par HPLC semi-préparative est réalisée selon le protocole mis en place par Ellingson et *al.* [152]. Jusqu'à 100 mg de LP peuvent être injectés par cycle dans une colonne en silice 5 $\mu$  Apollo Silica de dimensions 250 x 10 mm (Grace, Deerfield, E.-U.). Les phospholipides sont ensuite séparés par une procédure gradient en passant progressivement d'un mélange A (hexane-propanol-eau 6:8:0,75 v/v) à un mélange B (hexane-propanol-eau 6:8:1,55 v/v).

## II. Caractérisation de la composition des lipides

### 1. Séparation des différentes classes de lipides

L'analyseur IATROSCAN® MKV est un système de mesure basé sur le couplage de la chromatographie sur couche mince (CCM) et la détection par ionisation de flamme (DIF). Cette technique permet de séparer, d'identifier et de quantifier des échantillons de quelques nanogrammes, la limite de résolution de l'appareil étant fixée à 0,5 nanogramme. La CCM est assurée par des chromarods® en quartz de 0,9 mm de diamètre (SIII) sur lequel est déposée une couche de silice de 75 à 100  $\mu$ m d'épaisseur.

Après dépôt des échantillons sur les chromarods®, ces derniers sont plongés dans des mélanges de solvants variés pour effectuer la migration. La détection se fait par brûlage des chromarods® dans laquelle les éluas sont vaporisés et ionisés. Les données sont ensuite traitées par un logiciel Chromstar® (Fig. II.4).

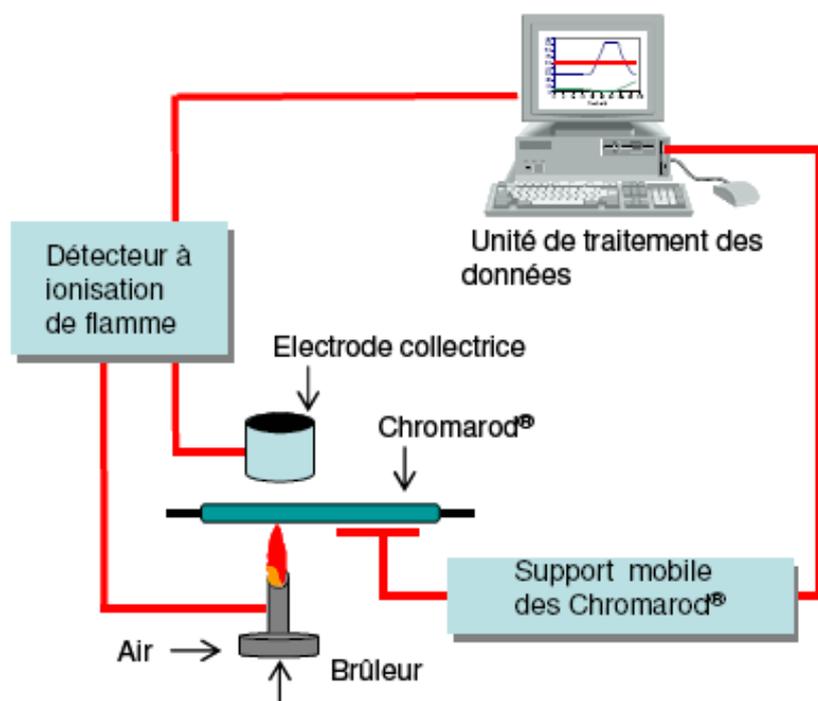


Figure II.4. Schéma du principe de fonctionnement du Iatroscan ®

### *Séparation des lipides neutres*

Le premier mélange de solvants utilisé pour la migration est un mélange apolaire qui sépare les lipides neutres des lipides polaires. Il est constitué d'un mélange d'hexane, d'éther diéthylique et d'acide formique (80/20/0,2 v/v). Après dépôt de l'échantillon (1 ou 2  $\mu\text{L}$ , concentration à 10 mg/mL), la migration dure 20 minutes à 20°C.

Des standards ont été utilisés afin d'identifier les composés présents :

- Pour les triacylglycérols : tripalmitine, 5 mg/mL, pureté 99%, Sigma
- Pour les diacylglycérols : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol, 5 mg/mL, pureté 99%, Sigma
- Pour les monoacylglycérols : 1-monostéaroyl-glycérol, 5 mg/mL, pureté 99%, Sigma
- Pour les acides gras libres : acide stéarique, 5 mg/mL, pureté 99%, Sigma

Afin de détecter tous les composants du mélange, il est nécessaire de réaliser un brûlage complet du chromarod® afin de déterminer le ratio des différentes classes de lipides. En effet, alors que les composés apolaires migrent sur le chromarod®, les composés polaires restent sur la ligne de dépôt.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

### *Séparation des différents types de phospholipides*

Outre le brûlage complet des chromarods®, il est également possible d'effectuer un brûlage partiel. Après migration dans un mélange de solvants apolaires et brûlage partiel, il est possible de faire migrer ces derniers dans un mélange polaire composé de chloroforme, de méthanol et d'ammoniac (65/35/5 v/v) pendant 45 minutes. Les différents composés polaires présents sont alors séparés par discrimination de leur temps de rétention. Tout comme pour les lipides neutres, des standards de phospholipides ont été utilisés pour l'identification :

- Phosphatidyléanolamine de cerveau caprin, pureté non précisée (Sigma)
- Phosphatidylcholine de jaune d'œuf, pureté 99% (Sigma)
- Lyso-phosphatidylcholine
- Phosphatidylsérine de cerveau bovin, pureté 98% (Sigma)
- Sphingomyéline de jaune d'œuf, pureté 98% (Biochemika)
- Phosphatidylinositol d'origine non précisée, pureté 50% (Sigma)

Les pics d'éluion sont déterminés pour les différents standards de PL sont les suivants (l'appareil affiche le résultat sur l'axe des abscisses en minutes) :

- PC : 0,25
- PE : 0,05
- PI : 0,44
- PS : 0,32
- SM : 0,32
- L-PC : 0,30 min

D'après ces résultats, l'ordre théorique d'éluion des PL par CCM-DIF sera donc le suivant : PE < PC < L-PC < SM - PS < PI. Cependant, la PC, L-PC, SM et PS ayant des temps de rétention très proches, il se peut que dans un échantillon contenant plusieurs classes de phospholipides, des interactions interviennent entre les différents PL et que l'ordre d'éluion en soit ainsi modifié.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

### 2. Détermination de la composition en acides gras

#### *Préparation des esters méthyliques par la potasse méthanolique*

100 mg d'échantillon sont pesés dans un tube en verre fermé par un bouchon à vis et dissous dans 5 mL d'hexane. On rajoute alors 0,2 mL de réactif de trans-estérification potasse/méthanol 2 M. Le tube est mélangé vigoureusement pendant une minute à l'aide d'un vortex après avoir été mis sous azote au préalable. Après une phase de repos de 10 minutes, deux phases se séparent. La phase supérieure est récupérée pour l'analyse CPG.

Cette méthode présente l'avantage d'être rapide pour la préparation des esters méthyliques mais s'avère cependant être peu efficace pour les acides gras libres.

#### *Programme d'analyse des acides gras par chromatographie en phase gaz*

L'analyse des esters méthyliques est réalisée sur un chromatographe Péri 2000 (Périchrom, Saulx-lès-Chartreux, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Ils sont séparés sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, épaisseur du film de 0,5  $\mu\text{m}$ ) garnie de polyéthylène glycol dopé à l'acide téréphtalique (Périchrom). Les températures du détecteur et de l'injecteur sont fixées à 260°C. Le programme utilisé pour l'analyse est le suivant : maintenue au départ à 120°C pendant 5 minutes, la colonne est portée à 180°C (39,9°C/min) et maintenue durant 8 minutes à cette température. La colonne est ensuite portée jusqu'à 220°C à une vitesse de 3°C/min, puis maintenue 20 minutes à 220°C. Le refroidissement s'effectue à raison de 39,9 °C/min.

L'identification des pics est réalisée à l'aide de deux standards d'acides gras fournis par la société Supelco (Bellefonte, USA) : PUFA 1 (source marine) et PUFA 2 (source animale). Le logiciel Winlab 3 (Périchrom, Saulx-lès-Chartreux, France) permet l'intégration des chromatogrammes.

### 3. Détermination des espèces moléculaires

#### *Principe de la spectrométrie de masse*

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires. Cette technique, rapide et spécifique, permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase liquide haute précision. L'association d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces.

Le principe consiste à introduire un composé organique dans le spectromètre de masse qui est ensuite ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

Un profil à la fois quantitatif et qualitatif a été élaboré à partir de cette méthode, et a permis d'identifier les espèces moléculaires les plus abondantes au sein de la fraction PC et de les quantifier de manière relative.

### *Conditions chromatographiques*

Le système HPLC Surveyor Plus a été utilisé. Les phospholipides sont séparés sur une colonne C18 Alltima, 150 x 2,1 mm (5 µm) avec une pré-colonne C18 Alltima, 7,5 x 2,1 mm (5 µm) (Alltech, USA) d'après la méthode décrite par Uran et al. [156].

Le chloroforme a été utilisé comme phase mobile A. La phase mobile B consiste en un mélange de méthanol avec 0,1% (v/v) d'acide formique, un ajout d'ammoniaque pour relever le pH à 5,3 (env. 0,05% v/v) et 0,05% (v/v) de triéthylamine. La séparation a été obtenue en utilisant un gradient commençant à 95% de la phase mobile A et 5% de la phase mobile B, diminuant le gradient à 70% de la phase mobile A en 11 minutes et en le diminuant encore jusqu'à 20% en 3 minutes supplémentaires. Cet équilibre a été maintenu pendant 4 minutes puis est revenu à 95% de la phase mobile A en 2 minutes. L'équilibre final est enfin maintenu dans ces conditions pendant 5 minutes. La période totale de séparation chromatographique dure 25 minutes. Le débit est de 0,2 mL/min et la température dans la colonne est de 25°C.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

### *Spectrométrie de masse*

Le système HPLC est couplé en ligne à un spectromètre de masse à trappe ionique linéaire LTQ (ThermoElectron Corporation, USA) équipée d'une sonde électrospray à 60°C opérant en mode ESI négatif. Comme la partie polaire de la PC contient une amine quaternaire, il est difficile d'obtenir une haute sensibilité de la détection en mode négatif. Le fait d'ajouter de l'acide formique dans le solvant d'élution permet de former des adduits anioniques  $[M-CH_3COO]^-$  lors de l'ionisation de la PC.

Le spectromètre intègre un pousse-seringue double pistons et une vanne d'injection/dérivation activés électroniquement. L'effluent provenant du système HPLC entre dans le spectromètre via un système de pompage différentiel assuré par une pompe hybride turbomoléculaire Leibold à deux étages et deux pompes à palettes de type Edwards. La température du capillaire de la sonde ESI est de 230°C et on applique sur ce capillaire une décharge de -5kV. Le débit de gaz « sheath » est d'approximativement 40 unités.

Les données sont traitées avec le logiciel et l'ensemble du système LC-MS sont contrôlés par le logiciel Xcalibur (version 2.0).

### *Séparation des espèces moléculaires de la phosphatidylcholine*

Une fragmentation MS<sup>n</sup> est effectuée afin de séparer et quantifier les différentes espèces moléculaires présentes dans la fraction de PC purifiée. Les manipulations MS sont effectuées avec une énergie de collision relative entre 35-40%. L'optimisation de la fragmentation est faite en mode ESI négatif, les ions fragmentés sont sélectionnés pour une  $m/z$  comprise entre 500 et 1000 alors que les conditions chromatographiques sont à un mélange de 80% de solvant A et 20% de solvant B.

### III. Etude structurale de la phosphatidylcholine

Le comportement de la PC anhydre et hydratée est étudié par le biais de méthodes croisées : la microscopie à lumière polarisée, la diffusion des rayons X aux petits angles et l'analyse thermique différentielle. Le recoupement des informations issues de chaque méthode permet d'élaborer le diagramme de phase binaire PC – eau.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

### 1. Préparation des systèmes PC-eau

La masse moléculaire calculée de la fraction PC purifiée est de 780 g/mol. Les échantillons dissous dans un mélange chloroforme/méthanol 2/1 (v/v) sont placés dans des tubes Ependorff étanches. Le solvant est évaporé en le plaçant sous un courant d'azote pendant une heure puis sous vide jusqu'à totale évaporation (environ 1h). Une quantité d'eau distillée appropriée est ensuite ajoutée afin d'obtenir un pourcentage massique spécifique en eau.

Le mélange est d'abord centrifugé à 11000 rpm pendant 3 minutes pour obtenir une première homogénéisation. Il est ensuite placé dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes, puis re-centrifugé à 11000 rpm pendant 3 minutes.

### 2. Examen au microscope optique

Les tubes sont ouverts et une petite quantité de substrat est placée sur une lame en verre préalablement nettoyée à l'alcool et recouverte d'une lamelle. L'observation est réalisée sur un microscope à lumière polarisée sur lequel est placée la lame. Il est équipé d'un système permettant le contrôle de la température à l'aide d'un bain-marie, la température de la lame est donc régulée par la température du thermostat. Les observations sont réalisées à 25 et 65°C.

### 3. Etude structurale aux rayons X

La PC est étudiée à des fractions massiques d'eau allant de 0,10 à 0,60. L'échantillon est placé dans un capillaire en verre de 1,5 mm de diamètre (Charles Supper Company, E.-U.) à l'aide d'une seringue, puis le capillaire est scellé à la cire. Le capillaire est ensuite placé dans un porte-capillaire en métal et circulaire qui permet la diffusion des rayons X au travers de l'échantillon. Un système thermostaté permettant le contrôle de la température du porte-capillaire a permis de réaliser des mesures à 25 et 40°C. Les mesures ont été faites sur un montage expérimental [157] composé d'un tube classique en cuivre ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ). La distance entre l'échantillon et le détecteur est de 527 mm. Le temps d'exposition est variable mais n'excède pas deux heures.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

### 4. Analyse thermique différentielle

Les systèmes PC – eau à différentes teneur en eau sont placés dans une capsule en aluminium et pesés sur une microbalance. Une cellule en aluminium vide et scellée est utilisée comme référence. Les mesures d'analyse thermique différentielle sont réalisées à l'aide d'un calorimètre haute sensibilité (Netzche, DSC 204 F1, Allemagne). Les échantillons sont soumis à un préchauffage à 60°C pour "effacer" le passé thermique des lipides. Ils sont ensuite refroidis à -60°C puis réchauffés à 60°C à une vitesse de 5°C/min. Chaque mesure est réalisée en triplicata. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Proteus (Netzsch, Allemagne).

### 5. Etude en monocouche

La détermination des isothermes de compression des phospholipides est réalisée par la méthode des films de Langmuir. Un volume précis de fraction de PC dissout dans un mélange de chloroforme/méthanol 2/1 (v/v) est déposé de manière homogène à l'aide d'une micro-seringue à la surface d'une cuve de Langmuir KSV LB 5000 en Teflon (KSV, Finlande) équipée de deux barrières Delrin hydrophiles qui permettent une compression symétrique et d'une plaque de Wilhelmy pour mesurer la tension à l'interface air/eau. Cette cuve est remplie d'eau MilliQ dont la tension de surface est contrôlée au début de chaque expérience et égale à 72,5 mN/m à 20°C. La surface de l'eau est nettoyée méticuleusement à l'aide d'une pompe à eau afin de garantir une surface exempte de poussière et permettant de maintenir la tension de surface de l'eau pure à 72,5 mN/m. Après le dépôt, le système est laissé au repos 10 minutes afin de permettre l'évaporation du solvant puis la compression est initiée par le rapprochement des barrières à une vitesse de 1 cm/min. La température est maintenue constante à 20°C.

Connaissant la masse moléculaire de l'échantillon, l'aire de la cuve ainsi que le volume exacte d'échantillon déposé, il est possible de déterminer l'aire moyenne par lipide en fonction de la pression de surface appliquée.

### IV. Hydratation de la phosphatidylcholine

#### 1. Protocole expérimental

La détermination des isothermes de sorption et l'étude des caractéristiques liées à l'hydratation de l'eau qui en découlent est réalisée par la méthode DVS (Dynamic Vapor Sorption). Cette méthode permet de mesurer l'absorption de vapeur d'eau par un produit lorsque celui-ci est mis en équilibre à une certaine humidité relative (HR) par le biais d'une microbalance.

La fraction PC dissoute dans un mélange chloroforme/méthanol 2/1 (v/v) est placée dans une des cuves de la balance. La plus grosse fraction de solvant est évaporée sous un courant d'azote. La cuve est ensuite replacée dans l'enceinte dont la température est contrôlée. Il a été décidé de réaliser les manipulations à 25°C, température au dessus de la température de transition de phase de la PC.

Le solvant restant est totalement évaporé et l'échantillon de PC est maintenu à une humidité relative de 0% jusqu'à stabilisation de la masse. De ce fait, l'échantillon est d'abord totalement dépourvu de son eau et se retrouve à l'état « anhydre ». Il subit ensuite une montée en humidité relative de 0 à 95% par le biais de 10 paliers successifs. L'appareil (Surface Measurement Systems, London, UK) permet de mesurer la prise de poids de l'échantillon due à l'adsorption d'eau en temps réel à  $10^{-4}$ g près et, de ces mesures, sont tirées plusieurs informations : la détermination des isothermes de sorption, la cinétique d'hydratation et les vitesses initiales d'hydratation à chaque palier d'humidité relative. La durée de chaque palier varie de 1 à 16h selon le taux d'humidité.

#### 2. Modélisation mathématique des données expérimentales

Plusieurs auteurs ont proposé des modèles mathématiques sous forme empirique pour décrire la relation graphique entre la teneur en eau d'un produit, l'humidité relative et la température. Dans notre cas, trois modèles mathématiques sont utilisés pour décrire les résultats expérimentaux: le modèle BET (Brunauer–Emmett–Teller) (équation 2), le modèle GAB (Guggenheim–Andersen–de Boer) (équation 3), et le modèle TSS (Third Stage Sorption) (équation 4).

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

$$\alpha = \alpha_0 \frac{C a_w}{(1 - a_w)(1 + (C - 1)a_w)} \quad \text{Équation 3}$$

$$\alpha = \alpha_0 \frac{C K a_w}{(1 - K a_w)(1 + (C - 1)K a_w)} \quad \text{Équation 4}$$

$$\alpha = \alpha_0 \frac{C K h_{TSS} a_w}{(1 - K a_w)(1 + (C h_{TSS} - 1)K a_w)} \quad \text{Équation 5}$$

où  $\alpha$  est la quantité d'eau adsorbée donnée en molécules d'eau/lipide,  $\alpha_0$  est la monocouche d'eau entourant les têtes polaires donnée en molécules d'eau/lipide, et  $C$  est une constante d'énergie,  $K$  est une constante caractéristique corrigeant les propriétés des molécules d'eau en multicouche comparées aux propriétés en solution, et  $H_{TSS}$  est une constante spécifique pour ce modèle.

L'application d'un modèle par rapport à un autre dépend de l'humidité relative dans la zone étudiée. En effet, le modèle BET est utilisé pour des faibles humidités relatives ( $0 < HR < 40\%$ ), le modèle GAB couvre une gamme d'humidité relative plus large ( $0 < HR < 80\%$ ), enfin le modèle TSS permet d'approcher les valeurs proches de 100% [158].

### **Partie 3 : Simulation en dynamique moléculaire**

#### I. Introduction

Les processus et les fonctions des macromolécules biologiques dépendent toujours des propriétés structurelles et dynamiques à l'échelle moléculaire de leurs composants. Les informations sur ces processus obtenues par les techniques expérimentales conventionnelles sont souvent très limitées et insuffisantes pour mieux comprendre et mettre en évidence ces fonctions avec une résolution atomique.

La dynamique moléculaire (DM) est une méthode appartenant au champ de la modélisation numérique. Cette dernière indique l'utilisation des ressources informatiques pour la chimie en partant de la mécanique quantique jusqu'à la dynamique de grands systèmes moléculaires complexes. Elle a pour but de comprendre et de prédire les propriétés mésoscopiques et macroscopiques, basé sur la connaissance détaillée de l'échelle atomique.

#### II. Principe

La DM est une méthode déterministe qui consiste à décrire *in silico* l'évolution d'un système moléculaire au cours du temps en intégrant les équations du mouvement pour chaque atome. Elle permet de calculer les grandeurs macroscopiques du système étudié, particulièrement les propriétés structurelles et thermodynamiques.

Chaque atome dans le système est considéré comme une masse ponctuelle avec ses propriétés physiques et chimiques correspondantes comme la masse, la charge et le type d'atome. Le déplacement de chaque atome est dirigé par sa propre énergie cinétique et par les forces que l'entourage exerce sur lui. Les mouvements des atomes d'un système sont déterminés en intégrant numériquement les équations du mouvement avec un pas d'intégration défini. Les nouvelles vitesses et les positions des atomes du système à l'instant  $t$  sont calculées en fonction de leurs vitesses et leurs positions à l'instant  $t-1$ . En intégrant pas à pas les équations du mouvement, on obtient les trajectoires de chaque atome en fonction du temps. Pour plus de détails concernant les principes fondamentaux de la dynamique moléculaire et l'ensemble des équations mises en jeu, le lecteur est invité à consulter les références [159], [160] et [9].

Les équations engagées sont :

$$f_i(t) = m_i a_i = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad \text{Équation 6.}$$

où  $m_i$  et  $r_i$  sont respectivement la masse et la position du  $i^{\text{ème}}$  atome du système,  $a_i$  son accélération et  $f_i(t)$  la force microscopique agissant sur l'atome  $i$  à l'instant  $t$ , telle que :

$$f_i(t) = - \frac{\partial}{\partial r_i} U \quad \text{Équation 7}$$

L'équation 5 représente l'équation du mouvement, donnée par la seconde loi de Newton. La force agissant sur chaque atome est déterminée par la fonction d'énergie potentielle  $U$  donnée par exemple par :

$$U = \sum_{\text{liaisons}} \left[ \frac{k_b}{2} (r_{ij} - r_{ij}^{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{angles}} \left[ \frac{k_\theta}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{dièdres}} \left[ \frac{k_\phi}{2} (\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{charges}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right] \right] \right] \quad \text{Équation 8}$$

Les trois premiers termes reflètent les interactions intramoléculaires entre les liaisons covalentes et le dernier terme décrit les interactions non liées (van der Waals et électrostatiques). Les constantes  $k^b$ ,  $k^\theta$  et  $k^\phi$  sont les constantes de force pour les liaisons covalentes, les angles et les dièdres respectivement.  $r_{ij}$  correspond à la distance entre les atome  $i$  et  $j$ ,  $A_{ij}$  et  $B_{ij}$  sont les paramètres de Lennard-Jones et  $q$  est la charge partielle. Cette fonction constitue la clé de voûte des calculs moléculaires car son rôle est de reproduire les interactions intra- et intermoléculaires du système aussi fidèlement que possible (cf. détails ci-dessous).

### 1. Limitations de la dynamique moléculaire

La DM comporte un certain nombre de limitations. La fonction potentielle  $U$  (équation 7) nécessite un grand nombre de paramètres pour les charges partielles, les interactions de Van der Waals, les valeurs d'équilibre pour les liaisons, les angles et dièdres et les constantes de force. La plupart des ces valeurs peuvent être obtenues par l'expérience ou par calculs quantiques, mais du fait de la simplification de la fonction potentielle, aucune garantie ne permet de prédire que ces paramètres donneront de bons résultats [161]. Cette incertitude dans

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

la détermination des paramètres nécessite de tester ces paramètres de manière approfondie sur des systèmes simples et de comparer les résultats avec des résultats expérimentaux.

La seconde limitation est la durée maximum pour le pas de temps pour laquelle l'intégration des équations de mouvement reste stable. De manière générale, une durée de 2 fs ( $10^{-15}$  s) est utilisée. De ce fait, cela limite le temps total pour une simulation, en fonction des caractéristiques des machines de calcul. Finalement comme les forces sont calculées entre pair d'atomes, cela impose une taille maximale du système qui ne peut excéder quelques centaines de milliers d'atomes, correspondant à des systèmes de quelques dizaines de nm pour effectuer des calculs dans des temps raisonnables.

La troisième limitation majeure de la dynamique moléculaire standard est le traitement classique du système. De ce fait, il est impossible d'envisager des réactions chimiques par DM sans décrire le système, au moins de façon partielle, par mécanique quantique.

### III. Champs de force

La plupart des champs de forces de modélisation moléculaire utilisés de nos jours pour l'étude de systèmes moléculaires, décrivent les interactions présentées dans l'équation 7 et peuvent être présentés selon la simplification suivante :

$$E_T = \overbrace{E_{\text{liaison}} + E_{\text{valence}} + E_{\text{torsion}}}^{\text{Termes liés}} + \overbrace{E_{\text{VDW}} + E_e}^{\text{Termes non liés = 4}^{\text{ème}} \text{ membre}}$$

$\begin{matrix} \nearrow & \nearrow & \nearrow \\ \text{1}^{\text{er}} \text{ membre} & \text{2}^{\text{ème}} \text{ membre} & \text{3}^{\text{ème}} \text{ membre} \end{matrix}$

où  $E_T$  est l'énergie totale du système,  $E_{\text{liaison}}$  l'énergie dépendant des liaisons,  $E_{\text{valence}}$  l'énergie liée aux angles,  $E_{\text{torsion}}$  l'énergie liée aux dièdres,  $E_{\text{VDW}}$  l'énergie des interactions de Van der Waals et  $E_e$  l'énergie des interactions électrostatiques.

Le champ de force contient des termes qui décrivent l'interaction de la partie non-liée du système représentée par les interactions de Van der Waals et électrostatique (équation 7). Des champs de force plus élaborés peuvent contenir de plus nombreux termes, mais ils possèdent

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

invariablement ces quatre composantes. Une liste plutôt exhaustive des différents champs de force existant peut être trouvée dans la littérature [162].

Pour notre étude, nous avons utilisé les paramètres du champ de force CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics ; CHARMM 27) [163]. Le développement et la maintenance de CHARMM sont assurés par un réseau de collaborateurs à travers le monde autour de Martin Karplus et de son groupe à Harvard. Ce champ de force a été amélioré à partir d'un champ de force qui avait déjà donné des résultats très acceptables avec des lipides présentant peu d'insaturations [100], [164].

### 1. Les interactions liées

Les interactions liées, ou forces intramoléculaires, sont des dérivées des fonctions d'énergie empiriques qui déterminent les déformations géométriques (liaisons covalentes, les angles, dièdres propres et dièdres impropres). Ce ne sont pas exclusivement des interactions entre paires, mais également des interactions à 3 et 4 membres puisque la liaison covalente représente une interaction entre 2 membres, la déformation des angles concerne 3 membres et les interactions d'angles dièdres concernent 4 membres.

#### *Liaisons covalentes entre atomes*

La liaison covalente est généralement modélisée par un potentiel harmonique. Cette approximation décrit le déplacement d'une paire d'atomes autour de sa position d'équilibre (Fig. II.5). Le potentiel d'énergie de la liaison covalente s'écrit :

$$U_1 = k_{ij} (r_{ij} - r_0)^2 \quad \text{Équation 9}$$

où  $r_{ij}$  est la longueur instantanée (en Å) de liaison entre les atomes  $i$  et  $j$ ,  $r_0$  la valeur de la longueur de liaison à l'équilibre et  $k_{ij}$  la constante de force (en kcal.mol<sup>-1</sup>. Å<sup>-2</sup>).

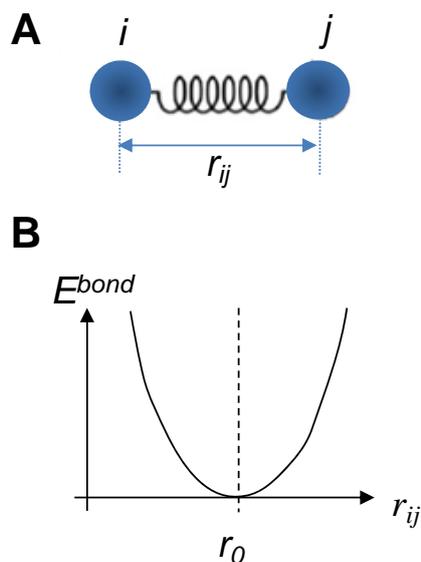


Figure II.5. Energie liée à l'élongation des liaisons. (A) 2 particules  $i$  et  $j$  sont liées par une liaison covalente de longueur  $r_{ij}$  équivalant à un ressort. (B) Profil de l'énergie  $E^{bond}$  en fonction de la longueur instantanée de la liaison entre les particules  $i$  et  $j$  ( $r_{ij}$ ) où  $r_0$  est la longueur de la liaison à l'équilibre.

#### *Déformation des angles entre atomes liés*

Ce potentiel est généralement représenté par une fonction harmonique qui prend en compte les déformations angulaires entre deux liaisons covalentes autour d'angle d'équilibre (Fig. II.6).

Il s'écrit :

$$U_2 = k_{ijk} (\theta_{ijk} - \theta_0)^2 \quad \text{Équation 10}$$

où  $\theta_{ijk}$  est l'angle formé par les atomes  $i, j, k$  (en degrés),  $\theta_0$  la valeur de l'angle à l'équilibre et  $k_{ijk}$  la constante de force. La contribution de chaque angle est caractérisée par une constante de force et une valeur de référence. Les angles sont exprimés en degrés,  $k_{ijk}$  en  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

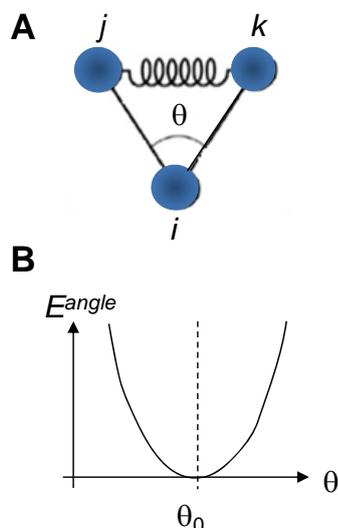


Figure II.6. Energie liée à la déformation des angles et des angles impropres. (A) 3 particules  $i, j$  et  $k$  forment un angle  $\theta$  flexible ( $\theta_0$  à l'équilibre). (B) Profil de l'énergie  $E^{\text{angle}}$  en fonction de la déformation de l'angle formé par  $i, j$  et  $k$ .

### *Termes de torsions, dièdres et impropres*

Le terme énergétique de déformation des angles dièdres  $\varphi$  concerne trois liaisons et donc quatre atomes. Ce potentiel décrit les rotations possibles autour de l'angle dièdre. Il peut être exprimé par une somme qui détermine tous les minima et les maxima du dièdre formé par quatre atomes. Cette énergie peut être modélisée par une série de Fourier :

$$U_3 = \sum_{\mathbf{k}} (1 + \cos(n\tau - \tau_0)) \quad \text{Équation 11}$$

où  $n$  (entier sans dimension) traduit la périodicité de la barrière rotationnelle de l'angle dièdre  $\tau$  (comprise entre 1 et 6),  $k$  sa hauteur (en  $\text{kcal.mol}^{-1} \cdot \text{rad}^{-1}$ ) et  $\tau_0$  l'angle du décalage par rapport à l'état initial.

Un type spécial d'interactions d'angle dièdre (appelé impropre dièdre) est utilisé pour contraindre les atomes à rester dans un plan ou pour prévenir de la transition d'une configuration à une autre. Ce type de mouvement apparaît surtout dans une structure cyclique. Dans le champ de force CHARMM, la déformation des angles impropres autour d'un angle d'équilibre a pour expression :

$$U_4 = k (\delta - \delta_0)^2 \quad \text{Équation 12}$$

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

C'est aussi un potentiel harmonique dans lequel  $k$  est exprimé en  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{rad}^{-2}$ .

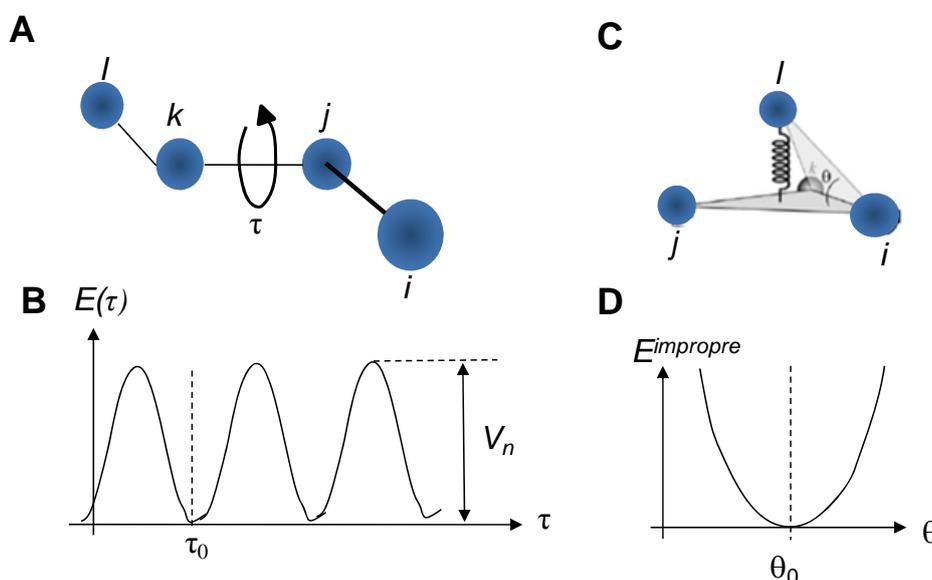


Figure II.7. Energie liée à la torsion des liaisons et à la déformation des angles impropres. (A) 4 particules  $i$ ,  $j$ ,  $k$  et  $l$  forment un angle dièdre  $\tau$ . (B) Profil d'énergie en fonction de  $\tau$ . (C) 4 particules  $i$ ,  $j$ ,  $k$  et  $l$  forment un angle  $\theta$  flexible,  $l$  est alors plus ou moins en dehors du plan ( $i$ ,  $j$ ,  $k$ ). (D) Profil d'énergie  $E^{impropre}$  en fonction de la déformation de l'angle formé par  $i$ ,  $j$ ,  $k$  et  $l$ .

## 2. Les interactions non liées

Les interactions non liées ne dépendent pas d'une relation de liaison particulière entre atomes. Ce sont des interactions qui s'effectuent à travers l'espace et qui sont souvent modélisées par une fonction inversement proportionnelle à la distance. Les termes non liés dans un champ de forces sont souvent considérés en deux groupes comprenant d'une part les interactions électrostatiques et d'autre part les interactions de van der Waals.

### *Interaction de van der Waals*

Les interactions de van der Waals traduisent la répulsion des atomes entre eux à courte distance et leur attraction à longue distance. La modélisation de cette interaction à l'aide de la mécanique quantique est connue, mais dans le cas d'un champ de forces une relation empirique simple pouvant être rapidement calculée est utilisée. La mieux connue est le potentiel de Lennard-Jones (Fig. II.8),  $U_{LJ}$ , qui prend la forme suivante dans le cas de deux atomes équivalents  $i$  et  $j$  :

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

$$U_{LJ} = 4 \epsilon_{ij} \left( \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) \quad \text{Équation 13}$$

où  $\sigma_{ij}$  est le diamètre de collision relié aux rayons de van der Waals des atomes et  $\epsilon_{ij}$  l'énergie minimale d'interaction entre les deux atomes.

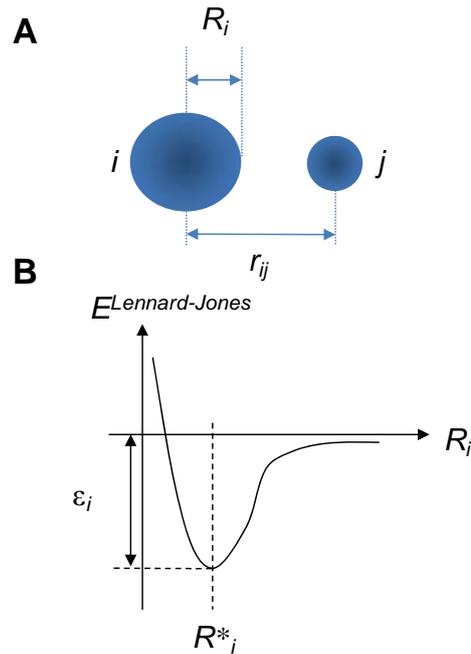


Figure II.8. Energie liée à l'interaction de Lennard-Jones. (A) 2 particules  $i$  et  $j$  sont distantes d'un rayon  $r_{ij}$ . (B) Profil d'énergie de l'interaction de Lennard-Jones en fonction de  $r_{ij}$ . Où  $R^*_i$  est le rayon de van der Waals de l'atome et  $\epsilon_i$  l'énergie de Lennard-Jones à la distance  $R^*_i$ .

### Interaction électrostatique

L'interaction électrostatique entre deux molécules (ou entre différentes parties d'une même molécule) est alors calculée comme une somme d'interactions entre des paires de points de charge  $q_i$  et  $q_j$  séparées d'une distance  $r_{ij}$  en utilisant les lois de Coulomb (Fig. II.9) :

$$U_{el}(r) = \frac{q_i q_j}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon_r r} \quad \text{Équation 14}$$

où  $\epsilon_r$  est la permittivité relative.

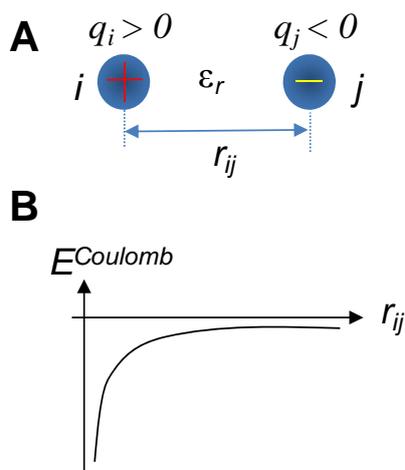


Figure II.9. Energie liée à l'interaction électrostatique. (A) 2 particules  $i$  et  $j$ , de charges respectives  $q_i$  et  $q_j$ , sont distantes d'un rayon  $r_{ij}$  dans un milieu de permittivité électrostatique  $\epsilon_r$ . (B) Profil d'énergie de l'interaction électrostatique en fonction de  $r_{ij}$  pour  $q_i$  et  $q_j$  de signe opposé (e.g.  $q_i > 0$  et  $q_j < 0$ ). Il est à noter que si  $q_i$  et  $q_j$  sont de même signe, on obtient la courbe opposée (symétrique par rapport à l'axe  $r_{ij}$ ).

### *Traitement des interactions non liées*

L'approximation de l'image minimale et l'utilisation d'un rayon de troncature sont bien adaptées aux calculs de force de van der Waals, qui diminuent très rapidement quand la distance augmente, mais pas dans le cas des interactions électrostatiques. En effet, le nombre de particules et donc de charges à prendre en compte augmente en  $r^3$  quand la distance  $r$  augmente, tandis que le potentiel électrostatique diminue en  $1/r$ , il n'y a donc qu'une convergence lente du potentiel. Sans rayon de troncature, les calculs sont très lourds, voire impossibles à mener et ce poids est augmenté par l'utilisation de conditions aux limites.

La méthode du rayon de coupure (*cutoff*) est très largement employée en DM classique. Cette méthode consiste à calculer seulement les interactions non-liées entre les atomes voisins se trouvant à une distance inférieure à la distance  $R_{cut}$ . Le programme utilisé doit permettre de construire des listes de paires non liées dans une sphère de rayon  $R_{pair}$  supérieur à  $R_{cut}$ , qui seront employées pour repérer tous les atomes voisins de l'atome  $i$  dans l'intervalle du rayon de coupure. Ces listes sont régulièrement remises à jour au cours de la dynamique moléculaire.

Une autre méthode appelée sommation d'Ewald, ou PME (pour Particle Mesh Ewald), consiste à diviser la somme d'énergie électrostatique en trois termes : la somme en réseau directe, la somme en réseau réciproque (transformée de Fourier rapide) et un terme correction

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

[165]. Elle a été proposée pour calculer les forces électrostatiques dans un environnement soumis à des conditions périodiques aux limites. Dans notre étude, la sommation d'Ewald a été utilisée, permettant d'obtenir des résultats réalistes avec un temps de calcul raisonnable [166].

### 3. Choix de l'ensemble thermodynamique

Il existe différentes façons en simulation de traiter les conditions macroscopiques limites. En effet, la température  $T$  et le nombre d'atomes  $N$  sont généralement maintenus constants. Cependant, il existe plusieurs options concernant le contrôle du volume  $V$  et de la pression  $P$ . Il est également important de distinguer les dimensions et pressions dans la direction latérale et dans la direction perpendiculaire à la bicouche. Si on considère que  $l$  est la hauteur de la boîte de simulation,  $A$  la surface latérale des lipides,  $\gamma$  la tension de surface et  $E$  l'énergie totale du système on obtient alors plusieurs ensembles thermodynamiques d'étude dont les plus traditionnellement utilisés sont : l'ensemble micro canonique ( $N, V, E$ ) où dans ce cas, le nombre d'atomes, le volume et l'énergie restent constants ; l'ensemble canonique ( $N, V, T$ ) où le nombre d'atomes, le volume et la température restent constants ; et l'ensemble isobare isotherme ( $N, P, T$ ) où la température, la pression et le nombre d'atomes restent constants. Pour les simulations dans l'ensemble NPAT où l'aire par lipide est également constante, il est nécessaire d'avoir au préalable une valeur précise de l'aire par lipide déterminée par l'expérience or il a été vu que pour un même lipide, l'estimation de sa surface moléculaire peut varier fortement [103].

### 4. Modélisations des bords du système

Dans le but d'éliminer les effets de bords du système et de reproduire des systèmes d'ordre macroscopique, les simulations de bicouches lipidiques consistent à prendre en considération un petit échantillon de lipides entourés de molécules d'eau confinés dans une cellule de simulation centrale. Afin de reproduire des systèmes plus grands on utilise les conditions périodiques aux limites (PBC) dans les trois directions de l'espace cartésien [159], [160]. Pour comprendre le principe de la méthode PBC, il faut imaginer une boîte cubique de particules qui serait répliquée dans toutes les directions pour donner un réseau périodique. Un objet qui dépasse les limites de la cellule de simulation sur une face réapparaît ensuite à la même vitesse où il disparaît de la face opposée (Fig. II.10). Les coordonnées de la particule dans les

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

boîtes images peuvent être calculées simplement en ajoutant ou en soustrayant des multiples entiers des dimensions de la boîte. En agissant ainsi, le système de lipides simulé correspond à un fragment soit d'un liposome multi-lamellaire soit d'un assemblage de bicouches orientées, similaire à celles déposées sur un substrat.

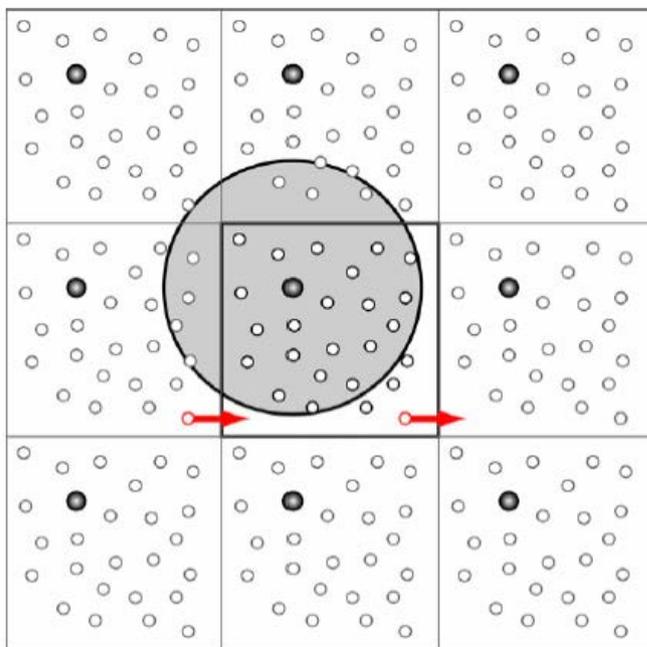


Figure II.10. Représentation bidimensionnelle des conditions périodiques utilisées en dynamique moléculaire. La boîte de simulation principale est représentée par un rectangle en trait épais. Les boîtes et les particules-images sont représentées autour en gris. La particule *i*, en noir, interagit avec ses voisines incluses dans un rayon représenté par la surface grise. Cette dernière n'est donc pas censée interagir avec l'une de ses images. La particule *j*, en rouge, subit les conditions périodiques aux limites du système. Lorsque qu'elle sortira de la boîte de simulation par la droite, son image rentrera par la gauche (adapté de [9]).

### IV. Données expérimentales nécessaires

Puisque les simulations en DM sont basées sur des modèles, il est primordial de valider les résultats de ces modèles simulés avec des données expérimentales. Lorsque les résultats expérimentaux tendent à s'accorder avec ceux obtenus par DM, on peut alors valider le modèle de départ et utiliser la simulation pour expliquer les résultats expérimentaux.

Comme il a été vu précédemment, il existe une variété de techniques expérimentales qui peuvent être appliquées aux systèmes lipidiques. Cependant, seules quelques propriétés peuvent être directement comparées aux résultats de simulation.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

### 1. Méthodes de diffraction

A ce jour, la diffraction de neutrons et de rayons X demeure l'outil le plus pertinent pour étudier la structure des bicouches lipidiques à l'échelle de l'atome [167]. Cependant, la phase cristal-liquide  $L_\alpha$  des bicouches est faiblement ordonnée et leurs fluctuations entraînent un nombre limité de pics observés [161]. L'une des informations la plus pertinente tirée des résultats de diffraction est le profil de densité (électronique ou atomique), dont le traitement du signal peut être déconvolu afin de déterminer la position des différents groupes d'atomes constituant la bicouche [103]. Les résultats de diffraction de rayons X haute-résolution tels que la surface par lipide et la distance de répétition dans les multicouches permettent de servir de référence pour comparer avec les résultats de simulation

### 2. RMN

La RMN est également utilisée de manière considérable pour tenter d'explorer l'organisation moléculaire des membranes lipidiques [167], [168]. Les résultats de RMN du proton sur des multicouches de lipides orientées permettent de définir les paramètres d'ordre des chaînes acyles que l'on peut ensuite comparer aux moyennes de paramètres d'ordre calculées par simulation [12].

La RMN du carbone permet de définir les temps de relaxation à plusieurs endroits du lipide [161], [169]. En général, les mouvements rapides obtenus dans ces procédures peuvent être comparés avec les mouvements rapides des simulations, qui sont eux-mêmes obtenus des fonctions de corrélation des vecteurs C-H (des chaînes carbonées). Cette analyse permet de valider la dynamique des simulations.

### 3. Autres méthodes

Alors que la diffraction de rayons X et de neutrons permet d'obtenir des informations indispensables sur la structure des bicouches, la réflexion de neutrons apporte des données uniques sur des bicouches simples au contact avec l'eau.

Rand et ses collaborateurs ont énuméré un grand nombre de paramètres pour toute une série de lipides [170]. Cette liste a été utilisée pour déterminer en simulation des tailles de boîte à volume constant mais de nombreuses valeurs dans cette liste ont un écart-type assez

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

conséquent. D'autres techniques ont également été employées afin de répondre à certaines propriétés spécifiques : la spectroscopie à résonance de spin électronique et des mesures de fluorescence utilisant des marqueurs fluorescents permettent de déterminer la perméabilité des membranes ; la spectroscopie infrarouge et/ou de Raman permet de déterminer les conformations des dièdres et l'emballage des chaînes carbonées [171] ; la DSC qui étudie la transition de phase des systèmes et enfin les données issues de diffusion quasi-élastique et incohérente de neutrons renseigne sur des échelles de temps similaires à la DM (1 ps – 10 ns), ce qui en fait un outil efficace pour comparer les résultats issus de cette technique avec ceux de simulation [172].

Bien que ces résultats soient importants dans des études spécifiques, ils manquent généralement de précision pour représenter des moyens critiques pour la validité d'une simulation.

### V. Conditions expérimentales des simulations

#### 1. Construction du système « PC saumon »

L'élaboration du système PC saumon a été réalisée à partir de la composition moléculaire définie par spectrométrie de masse. Cette dernière a été volontairement simplifiée afin de ne conserver que les espèces moléculaires principales : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PDPC), 1-palmitoyl-2-palmitoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PPPC), 1-palmitoyl-2-eicosapentaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PEPC) et 1-pentadecanoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PeDPC). Leurs structures chimiques sont présentées en Fig. II.11. Ces cinq lipides représentent 75% des espèces totales présentes dans l'échantillon de PC de saumon.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

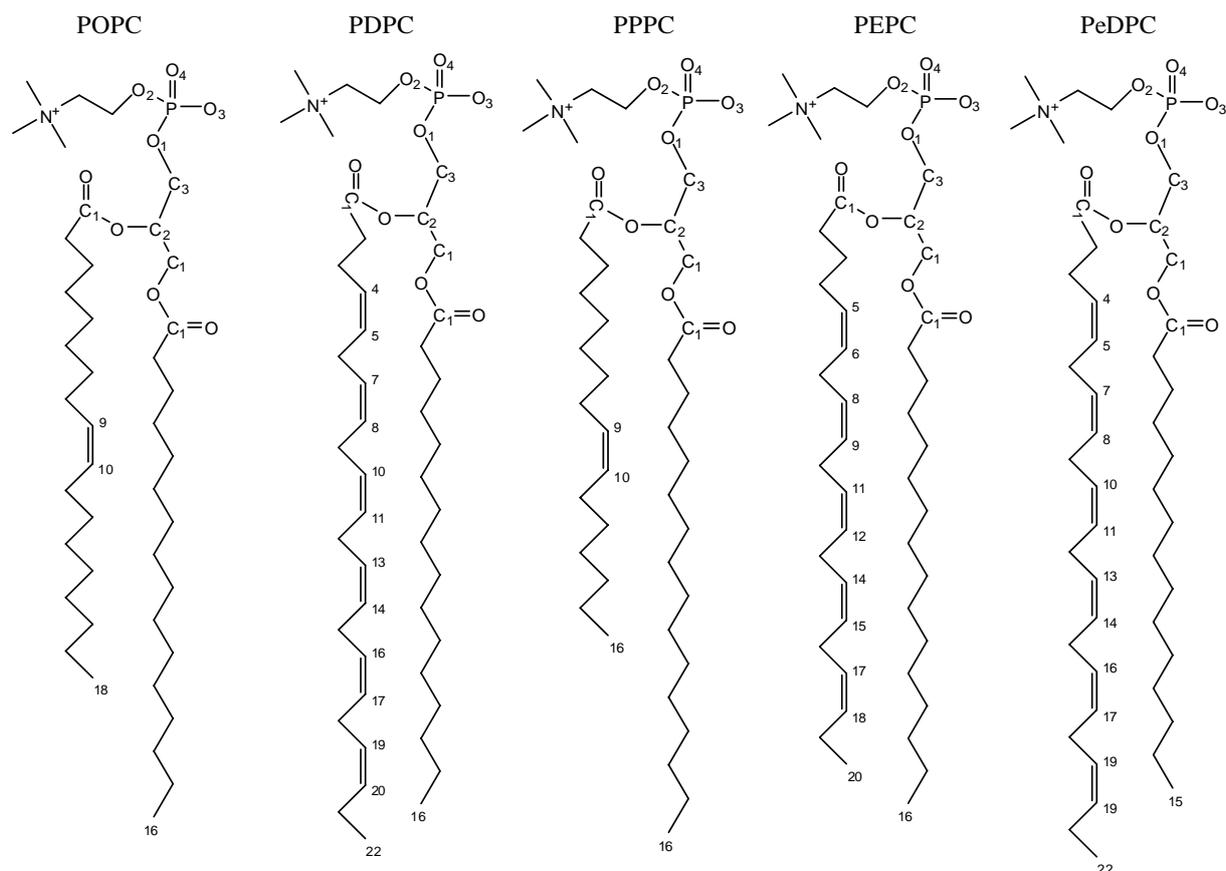


Figure II.11. Structure moléculaires des phospholipides POPC, PDPC, PPPC, PEPC et PeDPC rentrant dans la composition du mélange PC saumon.

Le ratio entre les pourcentages relatifs de chaque lipide est respecté de manière à obtenir des un système composé de 128 lipides contenant 32 POPC, 14 PDPC, 8 PPPC, 6 PEPC et 4 PeDPC (Tableau II.2). Dans le système considéré, chaque monocouche est composée de 64 lipides et construite de manière à ce que ces derniers soient distribués de façon aléatoire (Fig. II.12).

Les structures initiales des lipides PDPC, PEPC, PeDPC et PPPC ont été créées puisque de tels lipides n'existaient pas dans la base de données CHARMM, ou tout du moins, on pouvait trouver leurs résidus constitutifs. Pour ce faire, les paramètres des résidus préexistants tels que ceux concernant l'acide palmitique, la tête polaire glycérophosphocholine et le DHA ont été utilisés comme point de départ. Le modèle TIP3 a été utilisé pour modéliser les molécules d'eau.

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Tableau II.2. Composition moléculaire du système PC saumon contenant 128 lipides.

Masse molaire (g/mol)	Espèce moléculaire	Résidus impliqués	Nom	% relatif	Lipides par monocouche
760	C16:0 / C18:1	PALM/OLEI	POPC	50	32
806	C16:0 / C22:6	PALM/DHA	PDPC	22	14
732	C16:0 / C16:1	PALM/PLMO	PPPC	12.5	8
780	C16:0 / C20:5	PALM/EPA	PEPC	9.5	6
792	C15:0 / C22:6	PENT/DHA	PeDPC	6	4

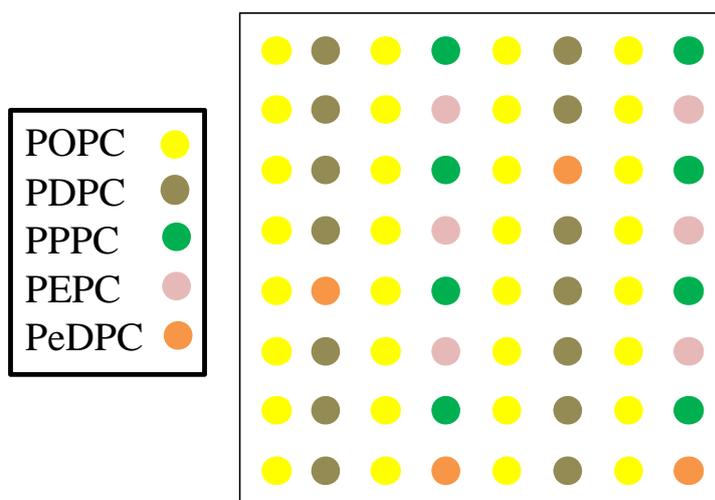


Figure II.12. Positionnement des différents lipides sur une monocouche de 64 lipides.

Les bicouches sont ensuite solvatées à plusieurs taux d'hydratation pour reproduire les conditions expérimentales de diffraction de rayons X, c'est-à-dire à 6, 10, 18, 28 et 37 molécules d'eau par lipide ce qui correspond respectivement à 775, 1325, 2376, 3633 et 4723 molécules d'eau dans chaque système (Figure II.13).

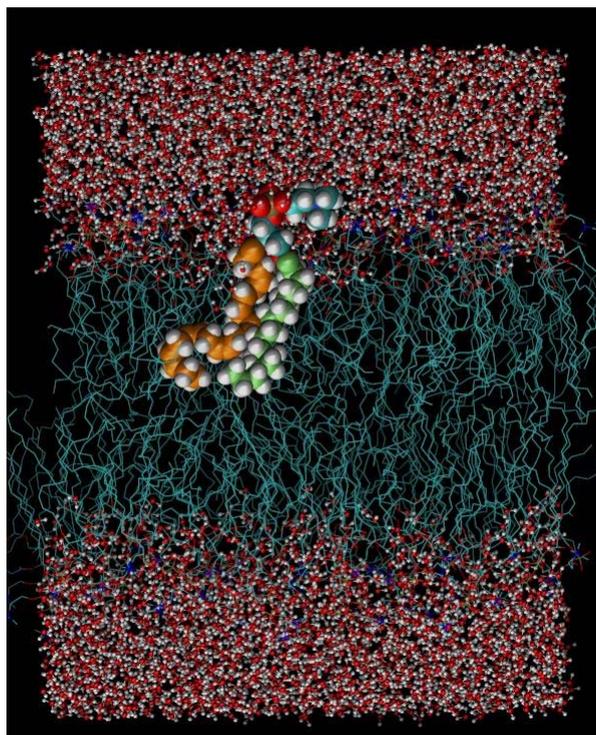


Figure II.13. Photo instantanée d'une bicouche de PC saumon équilibrée et solvatée à 37 molécules d'eau par lipide. Les chaînes lipidiques sont représentées en bleu et les molécules d'eau entourant la membrane en rouge et blanc. A titre indicatif, un résidu PDPC est agrandi : la chaîne DHA est représentée en orange et la chaîne palmitique en vert.

### 2. Construction des systèmes purs

Plusieurs systèmes purs ont été élaborés afin de comparer leurs propriétés avec celles du système de PC saumon. Pour cela, les deux lipides les plus représentatifs du mélange ont été retenus, à savoir le POPC et le PDPC. Ces derniers comportant des acides gras très différents (de par la longueur de chaîne et le nombre d'insaturations), il devient alors possible d'étudier l'influence de l'hétérogénéité de la composition du mélange PC saumon par rapport aux systèmes purs. Des configurations initiales de membranes de lipides purs ont été construites à partir de lipides isolés en utilisant le programme PACKMOL [173]. Chaque système consiste en une bicouche composée de 98 lipides ( $2 \times 49$ ), hydratée respectivement à 32 et 36 molécules d'eau par lipide pour le système POPC et PDPC.

### 3. Etude de monocouche

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Pour l'étude des monocouches en simulation, il a été décidé de tenter de reproduire les résultats expérimentaux obtenus par le biais des isothermes de compression avec la balance de Langmuir. Le système de départ consiste au système PC saumon hydraté à 37 molécules d'eau par lipide une fois ce dernier équilibré par simulation de dynamique moléculaire (variation de l'aire par lipide minime).

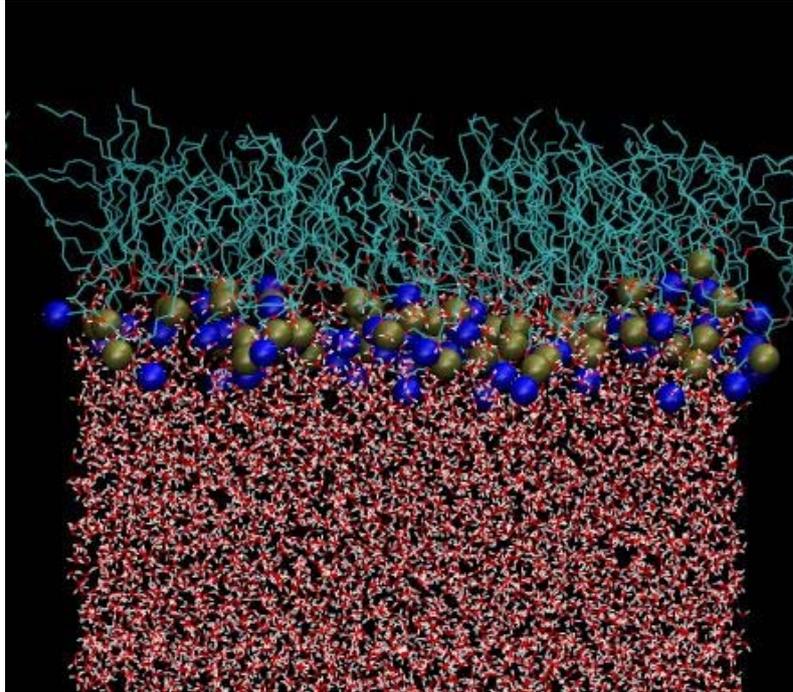


Figure II.14. Photo instantanée d'une monocouche de PC saumon simulée à l'interface aire/eau lorsque l'aire par lipide vaut  $70 \text{ \AA}^2/\text{lipide}$ . Les atomes de phosphore (ocre) et d'azote (bleu) sont grossis de manière à faire ressortir l'emplacement des têtes polaires.

A partir de là, une tension de surface est appliquée à la bicouche dans le but de compresser ou étendre le système et ainsi diminuer ou augmenter la surface moléculaire des lipides. Des tensions de surface comprises entre 20 et 30 mN/m ont été appliquées de manière à obtenir des aires par lipide comprises entre 40 et  $120 \text{ \AA}^2/\text{lipide}$  respectivement. Une fois la configuration des bicouches obtenue (lorsque le système atteint l'aire par lipide désirée), le système est transformé de façon à instaurer un film d'eau au centre de la cellule, entouré par deux monocouches de lipides. La taille de la cellule de simulation est augmentée dans la direction  $z$  pour créer de l'espace vide entre les monocouches de lipides et les bords de la cellule. L'épaisseur du film d'eau est également augmentée afin de prévenir toute interaction entre les têtes polaires des surfaces opposées (Figure II.14). Les simulations sont ensuite

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

réalisées dans un ensemble NVT de manière à garder l'aire par lipide constante, et avec les mêmes caractéristiques de simulation décrites plus haut.

La tension de surface des systèmes simulés est calculée ainsi :

$$\gamma_m = \frac{1}{2} (P_N - P_L) \times L_z \quad \text{Équation 15}$$

où  $P_N = P_{zz}$  est la pression normale,  $P_L = (P_{xx} + P_{yy})/2$  est la pression tangentielle et  $L_z$  est la taille de boîte dans la direction  $z$ . La détermination des tensions de surface calculées pour des surfaces moléculaires données permet de retracer l'isotherme de compression. La pression de surface à une aire est donnée par la relation suivante :

$$\pi = \gamma_w - \gamma_m \quad \text{Équation 16}$$

où  $\gamma_w$  est la tension à l'interface air/eau à 298K.

### 4. Minimisation de l'énergie du système

Pour tous les systèmes, excepté les plus simples, l'énergie potentielle est une fonction multidimensionnelle compliquée des coordonnées. La modélisation moléculaire s'intéresse aux points d'énergie minimale sur la surface d'énergie potentielle en sachant que les conformations engendrant ces points d'énergie minimale correspondent aux états stables du système. A partir de la configuration initiale définie par l'expérimentateur, il devient ainsi nécessaire d'instaurer une étape de minimisation de l'énergie globale du système avant d'effectuer les calculs de simulation à proprement parler. Cette étape permet, par exemple, de refixer certaines distances entre deux atomes qui seraient soit trop éloignés, soit trop proches par rapport à la valeur de la liaison instaurée dans le champ de force, ce qui aurait pour conséquence dans un calcul de dynamique d'aboutir à une configuration non physique (recouvrement des sphères de van der Waals ou orientation de groupements incompatibles avec l'environnement).

### 5. Equilibration des systèmes

Les simulations ont été effectuées en utilisant le code NAMD [174]. Les systèmes ont été modélisés dans l'ensemble NPT dans lequel les fluctuations des trois dimensions de la boîte

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

de simulation sont indépendantes. Les équations de mouvement sont intégrées par l'algorithme de *r-RESRA* avec un pas d'intégrale de 1 fs pour les interactions intramoléculaires, et un pas de 2 fs et 4 fs respectivement pour les forces à courte et longue portée. La dynamique de Langevin a été utilisée pour maintenir la température et la pression (1 atm) du système. Les contraintes de SHAKE ont été appliquées sur les liaisons entre les atomes d'hydrogène et les atomes lourds. Les forces électrostatiques sont évaluées par l'algorithme de PME avec une tolérance  $10^{-6}$  Å dans la somme en réseau direct avec un rayon de coupure de 11 Å.

Dans la plupart des cas, le système a été chauffé à 400 K pendant les premiers 2 ns de la dynamique afin de désordonner des chaînes aliphatiques. La simulation est ensuite poursuivie à la température désirée (cf détails chapitre résultats) pendant plusieurs nanosecondes, jusqu'à ce que la densité du système (ou taille de la boîte) se soit stabilisée.

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### Partie 1 : Extraction, purification et caractérisation de la composition de la phosphatidylcholine issue du saumon

#### I. Purification de la phosphatidylcholine

Il a été montré dans la partie Matériels et Méthodes que plusieurs techniques chromatographiques avaient été testées afin de purifier la phosphatidylcholine. La partie qui suit va présenter brièvement les résultats obtenus par HPLC, chromatographie sur couche mince et chromatographie sur colonne qui ont été mises en œuvre.

##### 1. Séparation des phospholipides par HPLC

La purification par HPLC a donné lieu au chromatogramme présenté en Figure III.1. Par cette procédure, la PC est bien isolée du reste des phospholipides et apparaît distinctement dans l'échantillon de lipides polaires (LP). L'ordre d'élution des phospholipides dans ces conditions est le suivant : PS < PE < PI < PC < SM.

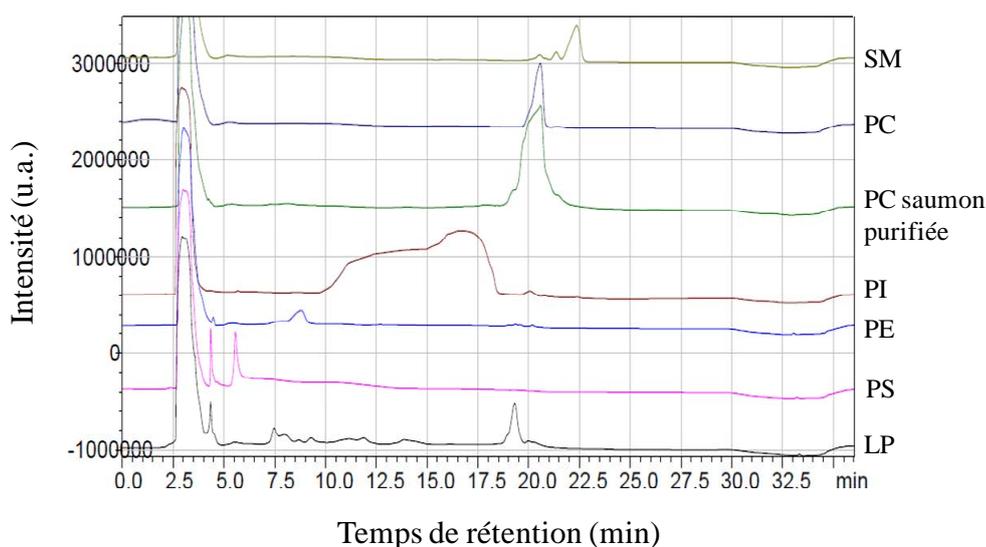


Figure III.1. Chromatogrammes des différents standards de phospholipides selon la procédure HPLC semi-préparative. Par souci de clarté, les profils ont été décalés sur l'axe des y. A titre d'exemple, un échantillon de PC purifiée à partir de LT de saumon est également représenté.

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

La séparation par HPLC présente l'avantage d'un plus grand degré de précision par rapport à la chromatographie sur couche mince ou en colonne de gel de silice. De plus, elle présente une plus grande protection des lipides vis-à-vis de l'oxydation. Cependant, les quantités de lipides qui peuvent être séparés sont très limitées. Ainsi, du fait qu'une colonne semi-préparative standard sera saturée avec 100 mg de LP, il faudra donc un nombre de cycles de purification important avant d'obtenir des quantités suffisantes pour réaliser le reste des manipulations. La durée d'un cycle étant de 40 minutes, il a été décidé de ne pas retenir cette méthode pour purifier des quantités importantes de PC à partir de LT ou LP.

### 2. Séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode facile à mettre en œuvre et en utilisant des plaques semi-préparatives, il est possible de séparer jusqu'à 150 mg de LP avant de saturer la plaque. Cependant, cette méthode présente un risque majeur vis-à-vis de l'oxydation, notamment au moment du dépôt et de la récupération de la fraction PC par grattage de la plaque. De plus, l'adsorption de la matière sur la silice est importante et conduit à des pertes de produit allant de 50 à 70%. Enfin, du fait également de la quantité limitée de LP pouvant être séparés par plaque, la CCM n'est pas la technique de séparation ayant été retenue pour purifier la PC du reste des phospholipides.

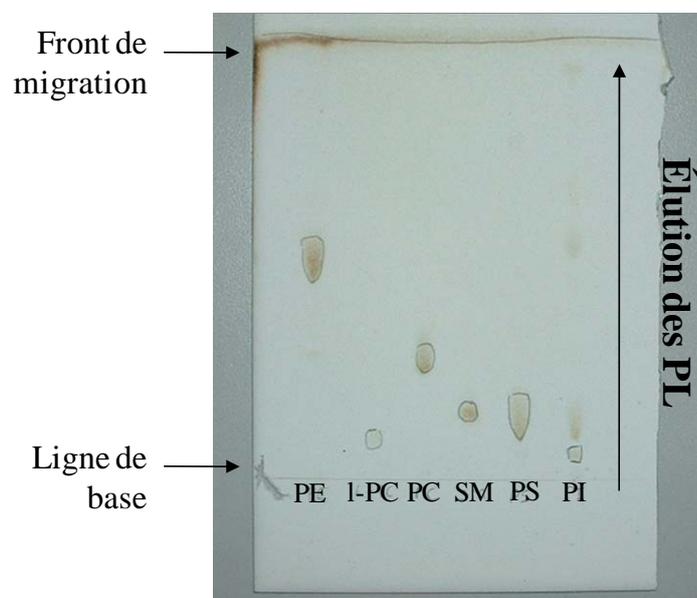


Figure III.2. Elution des standards de phospholipides par CCM dans un mélange de chloroforme/méthanol/ammoniaque (65/35/5 v/v) sur une plaque analytique.

### 3. Séparation par chromatographie sur colonne

#### *Rendement*

Afin de limiter les pertes au maximum dans la colonne ainsi que minimiser le nombre d'étapes, il a été décidé de séparer les différents types de PL directement après élution des LN et des GL. Le calcul du rendement moyen de la méthode a été effectué sur 8 essais en prenant en compte la masse théorique de PC dans l'échantillon de LT considéré et la masse de PC effectivement récupérée. Il a été déterminé à  $59,7 \pm 10,5$  %. Bien que cette technique dénote un rendement faible avec une grande variabilité dans les résultats, significatif d'une faible reproductibilité dans le rendement, il n'en demeure pas moins qu'elle reste l'approche où la plus grande quantité de LT peut être séparée en une fois. En effet, avec la méthode mise au point, 3 g de LT sont déposés pour chaque colonne.

#### *Vérification de la pureté de la fraction récupérée*

Une fois la fraction de PC récupérée, celle-ci est analysée par CCM couplée à une détection par ionisation de flamme (Iatroscan®) afin de contrôler sa pureté (Figure III.3). La composition moyenne en phospholipides généralement présents dans la fraction 3 est la PC à  $84,6 \pm 3,5\%$ , la lyso-PC à  $3,7 \pm 2,3$ , la SM à  $3,4 \pm 1,7\%$ , le PI à  $5,0 \pm 3,0\%$  et une fraction non identifiée à  $1,0 \pm 1,6\%$ . La PC, la lyso-PC et la SM ont une structure chimique proche car elles possèdent toutes les trois un groupement phosphorylcholine. C'est pourquoi il est délicat de les séparer en chromatographie en fonction de leur polarité.

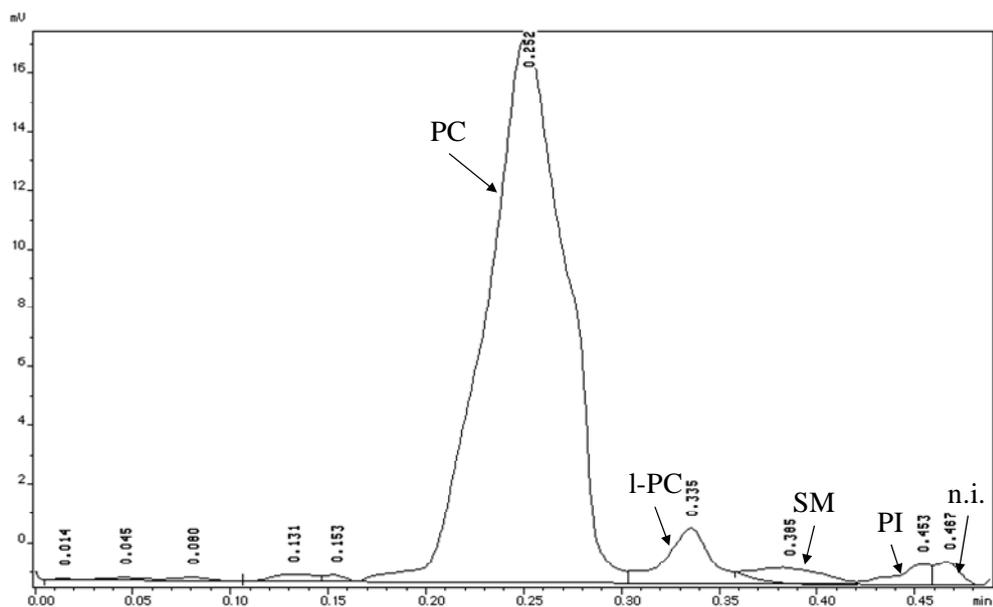


Figure III.3. Profil Iatroscan de la fraction PC purifiée par chromatographie sur colonne après élution dans un bain de chloroforme/méthanol/ammoniaque (65/35/5 v/v). n.i. correspond à la fraction non identifiée.

## II. Analyse de la composition

### 1. Composition des lipides totaux issus des têtes de saumon

Les classes de lipides totaux (lipides neutres et polaires) issus de têtes de saumon a été déterminée par CCM couplée à une détection par ionisation de flamme (Iatroscan®). Après chaque extraction des lipides totaux, un contrôle de la composition en lipides était effectué ainsi que la détermination de la composition en acides gras de la fraction LT afin de vérifier l'état d'oxydation de la matière. C'est pourquoi, le résultat présenté ici pour la composition en lipides neutres (LN) et lipides polaires (LP) de la fraction LT provient d'une moyenne sur 5 extractions réalisées à plusieurs mois d'intervalle sur une période de 2 ans. On a ainsi obtenu une moyenne de  $44,8 \pm 17,8$  % de LN et  $55,2 \pm 17,8$ % de LP. L'écart-type, assez élevé, démontre une hétérogénéité dans le temps de la composition de la matière première qui peut être le résultat du procédé, de la teneur initiale en huile mais également de la saisonnalité. Des différences dans les paramètres du procédé d'extraction enzymatique des têtes de saumon peuvent également conduire à une hétérogénéité de la composition des échantillons. Cette

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

dernière ne refléterait donc pas la composition réelle des lipides issus des têtes de saumon mais de la fraction obtenue après les différentes étapes du procédé enzymatique [175].

Les résultats de la composition détaillée des LN et LP sont présentés dans le Tableau III.1. La composition en LN a été déterminée après avoir isolé la fraction LN par chromatographie sur colonne puis analysé par CCM-DIF dans un mélange d'hexane/éther diéthylique/acide formique. Les teneurs en glycolipides et phospholipides ont été déterminées à partir des LT analysés par CCM-DIF après avoir éliminé les LN dans un premier temps puis fait migrer les LP dans un second mélange de chloroforme/méthanol/ammoniaque. La moyenne a été réalisée à partir de 6 échantillons sur une durée d'un an.

Tableau III.1. Teneur en lipides totaux et polaires dans les têtes de saumon (% relatif par rapport à la fraction LP uniquement)

Teneur en lipides (g/100g de matière sèche)	30,7 ± 5,2
Glycolipides	8,8 ± 2,0
Phosphatidylcholine	40,3 ± 9,1
Phosphatidyléthanolamine	14,7 ± 8,1
Phosphatidylinositol	5,2 ± 0,4
Sphingomyéline	3,6 ± 1,5
Phosphatidylsérine	3,6 ± 2,2
Lyso-phosphatidylcholine	0,6 ± 0,5
Non identifié	5,6 ± 2,6

La PC est le phospholipide majoritaire des composés polaires issus des LT des têtes de saumon (40,3 %). Viennent ensuite la PE, les glycolipides et à teneur équivalente, le PI, la SM et la PS. La lyso-PC est très peu présente. Ces résultats sont similaires à d'autres compositions en classe de phospholipides à partir de LT de poissons où la PC et la PE représentent plus de la moitié de la composition en PL [27], [176]. Les écarts-types pour certains PL sont assez importants et dénotent l'hétérogénéité de la composition des échantillons reçus, montré dans le paragraphe précédent.

### 2. Composition en acides gras des différentes fractions

La composition en acides gras des différentes classes (lipides totaux LT, lipides neutres LN, phospholipides PL et phosphatidylcholine PC) issues de la matière première a été déterminée par CPG (Tableau III.2).

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau III.2. Comparaison du profil des acides gras des différentes fractions extraites de têtes de saumon. Les données correspondent au pourcentage relatif d'acides gras totaux sur une moyenne de 5 échantillons avec leurs écart-type.

Acides gras	LT	LN	PL	PC
14:0	4,1 ± 0,8	4,9 ± 0,9	1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,4
15:0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2
16:0	16,0 ± 1,9	13,9 ± 0,8	16,4 ± 3,8	25,3 ± 3,2
16:1 n-9	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2
16:1 n-7	4,4 ± 0,8	5,1 ± 0,2	1,5 ± 0,4	2,3 ± 0,8
16:2 n-6	0,5 ± 0,4	0,3 ± 0,3	1,3 ± 0,5	0,4 ± 0,4
16:2 n-1	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
16:4 n-1	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	-	-
18:0	3,9 ± 0,4	3,1 ± 0,4	8,2 ± 2,3	2,3 ± 0,5
18:1 n-9	23,3 ± 2,7	28,7 ± 1,8	14,7 ± 3,4	15,9 ± 1,6
18:1 n-7	0,5 ± 1,3	-	1,3 ± 1,5	-
18:2 n-6	5,7 ± 1,3	7,7 ± 0,5	2,9 ± 0,8	1,5 ± 0,2
18:3 n-3	2,2 ± 0,6	3,0 ± 0,1	1,4 ± 0,5	0,9 ± 0,3
20:1 n-11	5,3 ± 2,2	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,7	0,3 ± 0,6
20:1 n-9	1,6 ± 2,4	5,2 ± 2,5	0,6 ± 0,4	0,9 ± 0,7
20:2 n-6	0,2 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,3	-
20:4 n-6	1,4 ± 0,4	0,8 ± 0,1	4,4 ± 0,9	2,1 ± 0,2
20:5 n-3	7,6 ± 1,6	7,0 ± 1,6	9,2 ± 1,2	11,2 ± 1,5
22:1 n-11	2,7 ± 2,2	3,1 ± 2,1	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,4
22:1 n-9	2,5 ± 2,3	2,1 ± 2,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
22:4 n-6	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,3
22:5 n-3	2,8 ± 0,6	2,8 ± 0,6	3,6 ± 0,6	2,9 ± 0,3
22:6 n-3	13,3 ± 4,1	7,6 ± 1,4	29,4 ± 5,2	27,9 ± 5,0
Σ AGS	24,3 ± 2,7	22,3 ± 1,3	25,9 ± 3,2	30,5 ± 4,1
Σ AGMI	38,9 ± 4,0	54,0 ± 2,8	20,6 ± 3,0	21,1 ± 2,6
Σ AGPI	35,1 ± 5,7	28,0 ± 1,6	53,4 ± 5,3	48,5 ± 6,4
Σ AGPI-LC	26,0 ± 6,8	18,6 ± 3,8	47,5 ± 6,5	45,7 ± 6,7
Σ n-3	27,4 ± 6,3	23,4 ± 1,5	48,1 ± 6,2	45,0 ± 6,5
Σ n-6	7,3 ± 1,1	4,4 ± 0,3	5,3 ± 1,6	3,5 ± 0,4
n-3/n-6	3,9 ± 1,3	5,3 ± 0,5	9,3 ± 3,8	13,0 ± 2,7

AGS : acide gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés, AGPI-LC : acides gras polyinsaturés à longue chaîne (de 20 à 22 atomes de carbone et de 4 à 6 doubles liaisons).

### *Composition des lipides totaux*

Les lipides totaux présentent une large gamme d'acides gras allant du C14:0 au C22:6 n-3. Néanmoins, quatre acides gras se démarquent des autres de part leur proportions relatives :

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

l'acide palmitique (16:0) compris entre 13,9 et 25,3% selon la fraction, l'acide oléique (18:1 n-9) compris entre 14,7 et 28,7%, l'EPA (20:5 n-3) compris entre 7,6 et 11,2% et le DHA (22:6 n-3) compris entre 7,6 et 29,4%. Les résultats sont du même ordre que ceux trouvés par Gbogouri et *al.* [176] qui ont déterminé la composition en acides gras des lipides totaux, lipides neutres et lipides polaires issus d'une extraction enzymatique de têtes de saumon. En effet, concernant la fraction des lipides totaux, la composition globale est similaire puisqu'on retrouve 24,3% d'acides gras saturés (AGS), 38,9% d'acides gras mono-insaturés (AGMI) et 35,1% d'acides gras polyinsaturés (AGPI), là où Gbogouri et *al.* (2006) ont trouvé 23,6% d'AGS, 31,3% d'AGMI et 45,1% d'AGPI. Cependant, des différences importantes surviennent pour certains acides gras en particulier, notamment concernant l'acide oléique qui est de 23,3% dans le présent travail et de 15,6% selon Gbogouri et *al.* Le DHA quant à lui est présent à 13,3% contre 18,2% chez Gbogouri et *al.* Cette différence peut être le résultat de la source des saumons qui diffère dans les deux études.

A titre comparatif, le Tableau III.3 présente les proportions en AGS, AGMI, AGPI et AGPI-LC de différentes parties du saumon d'Atlantique. Les têtes, notamment grâce aux yeux, et la peau sont les organes les plus riches en lipides. En revanche, ce sont les érythrocytes qui présentent la plus forte concentration en AGPI-LC même si, globalement, toutes les parties du saumon contiennent au minimum 20% d'AGPI-LC. Outre la saisonnalité, le mode de croissance et le type d'alimentation influent grandement sur la composition en acides gras du saumon.

Du fait de l'intérêt croissant d'une augmentation du ratio n-3/n-6 [39], [33], [36], nous avons également comparé les ratios n-3/n-6 pour les différentes parties du saumon. En effet, la consommation d'huiles de poisson enrichies en AGPI n-3 permet de contrebalancer l'excès d'AGPI n-6 dénoté dans les régimes alimentaires des sociétés occidentales. Certains extraits présentent des ratios élevés soulignant une forte teneur en n-3 et une faible teneur en n-6, comme les muscles blancs ou dorsaux et les érythrocytes. Les lipides de têtes de saumon présentent un ratio plus faible du fait de leur forte teneur en acide linoléique (18:2 n-6).

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau III.3. Comparaison de la teneur en lipides totaux et de la composition en acides gras pour différentes parties du saumon d'Atlantique (*Salmo salar*). Les résultats pour la composition en acides gras sont donnés en % relatif, ceux pour la teneur en lipide en % massique.

Source	LT	AGS	AGMI	AGPI	AGPI-LC	n-3/n-6	Ref.
Têtes	32,3	24,3	38,9	35,1	26	3,9	<sup>a</sup>
Erythrocytes	n.m.	29,3	12,4	4,1	55,4	13,2	[177]
Muscles blancs sauvage	n.m.	14,7	29,9	38,8	37,5	12,9	[178]
Muscles blancs élevage	n.m.	13,9	44,8	27,7	25	13,8	
Epiphyse (huile poisson)	n.m.	26,1	22,6	39,4	32,5	4,1	[179]
Leucocytes	n.m.	41,2	31,7	7,4	19,4	2,6	
Cerveau	7,1	19,5	39,1	41,4	33,7	5	[180]
Yeux	35,9	15,9	48,5	35,6	21,8	2,6	
Peau dorsale	28	16,5*	16*	30,5*	26,5*	8,8	
Peau ventrale	52	16*	17*	22,5*	20,1*	6,3	[181]
Muscles dorsaux	12	9,5*	6*	24,5*	21,9*	14,6	
Chair (huile vég.)	12,8	17,9	49,9	32,2	7,7	1	[182]
Chair (huile poisson)	11,6	22,6	43,7	33,6	23,9	4,2	

Légende : \* valeurs sont données en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ; les précisions entre parenthèses correspondent au type d'alimentation reçu par les saumons (à base d'huile végétale ou huile de poisson) ; n.m. : information non mentionnée ; <sup>a</sup> : résultats déterminés dans la présente étude.

### *Composition des lipides neutres et polaires*

La différence principale entre la composition en acides gras de la fraction neutre et de la fraction polaire est le ratio AGMI/AGPI. En effet, pour la fraction des lipides neutres, plus de la moitié des acides gras sont des AGMI (54%) et on dénote une teneur limitée en AGPI (28%) alors que les lipides polaires sont eux enrichis en AGPI (53,4%) notamment en EPA et en DHA qui comptent pour plus de 75% des AGPI. Cette tendance est généralement retrouvée dans les phospholipides de sources marines où on assiste à un enrichissement en AGPI par rapport aux acylglycérols, plus riches en AGMI [183], [78], [184], [79].

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau III.4. Comparaison de composition en acides gras de plusieurs sources naturelles de phosphatidylcholine et impact sur leur ratio n-3/n-6.

Source	Espèce	% AGPI	% EPA	% DHA	n-3/n-6	Réf.
Têtes de saumon	<i>Salmo salar</i>	48,5	11,2	27,9	13	<sup>a</sup>
Œuf	<i>Gallus gallus domesticus</i>	24,1	0	1,1	9,3	<sup>a</sup>
Soja	<i>Glycine max</i>	73	0	0	13	<sup>a</sup>
Erythrocytes de saumon	<i>Salmo salar L.</i>	51,5	6,6	41,0	20,7	[177]
Leucocytes de saumon	<i>Salmo salar L.</i>	29,3	7,3	12,3	3,5	[177]
Cœur de saumon	<i>Salmo salar</i>	34,9	6,4	24,2	11,5	[185]
Foie de saumon	<i>Salmo salar</i>	30,5	4,8	21,2	10,7	[185]
Rétine de saumon	<i>Salmo salar</i>	38,4	4,4	31,2	23,4	[185]
Cerveau de saumon	<i>Salmo salar</i>	16,3	2,9	11,5	17,2	[185]
Œufs de truite	<i>Onchorynchus mykiss</i>	46,4	7,1	27,1	6,6	[27]
Moule	<i>Perna viridis</i>	46,3	20,0	17,2	7,2	[79]

Le manque de référence indique qu'il s'agit de résultats personnels obtenus dans cette étude ;  
<sup>a</sup> : résultats de la présente étude

### *Composition de la phosphatidylcholine*

La composition en acides gras de la fraction PC est similaire à celle de la fraction PL si ce n'est que l'acide palmitique y est retrouvé en plus forte proportion (25,3%) au détriment de certains acides gras polyinsaturés. On en déduit donc qu'il existe des variations importantes sur la répartition des acides gras selon le type de phospholipide. Le Tableau III.4 répertorie d'autres compositions de PC d'origine naturelle et leur teneur en AGPI, EPA et DHA. Parmi ces sources, les têtes de saumon ont un pourcentage élevé en AGPI, EPA et DHA par rapport au reste des sources. Les érythrocytes, rétine et cœur de saumon ont également des proportions intéressantes pour ces acides gras, de même que les œufs de truite. Les proportions ont également été données pour la PC d'œuf et de soja. Ces deux sources ne présentent pas des taux en EPA et DHA intéressants et la majeure partie des AGPI de la PC de soja est constituée par l'acide linoléique (18:2 n-6).

3. Détermination des espèces moléculaires

Le couplage chromatographie liquide – spectroscopie de masse (LC-MS) permet une détermination à la fois qualitative et quantitative des espèces moléculaires d'un mélange de phosphatidylcholines. La détection des espèces PC est faite en mode négatif. Elle est rendue possible par la formation d'adduits anioniques  $[PC+formiate]^-$  du fait de l'ajout d'acide formique dans le solvant d'élution. La mise en évidence des espèces moléculaires de la famille PC est obtenue lors de l'acquisition en mode  $MS^2$ , c'est-à-dire après une première fragmentation. Il devient alors possible de détecter uniquement les espèces PC qui, suite à la collision, perdent un groupement méthyle de la choline et le contre-ion formiate, soit une perte  $m/z$  de 60 (Fig. III.4).

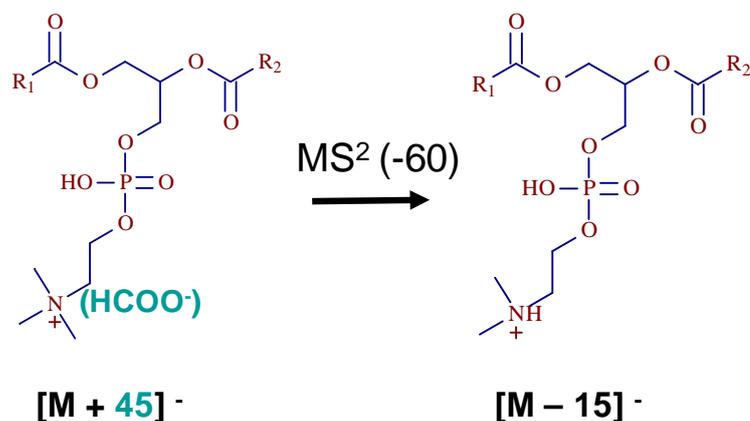


Figure III.4. Procédure de fragmentation  $MS^2$  qui conduit à la perte du contre-ion formiate et d'un groupement méthyle et permet l'identification de espèce phosphatidylcholine.

Une seconde dissociation induite par collision sur un adduit PC permet l'obtention de fragments anioniques correspondant à un acide gras libre et un (lyso-PC)- $CH_3$ . En déterminant les masses de tous les acides gras trouvés par chromatographie ainsi que les masses des lyso-PC, il devient possible d'identifier les anions isolés (Fig. III.5).

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

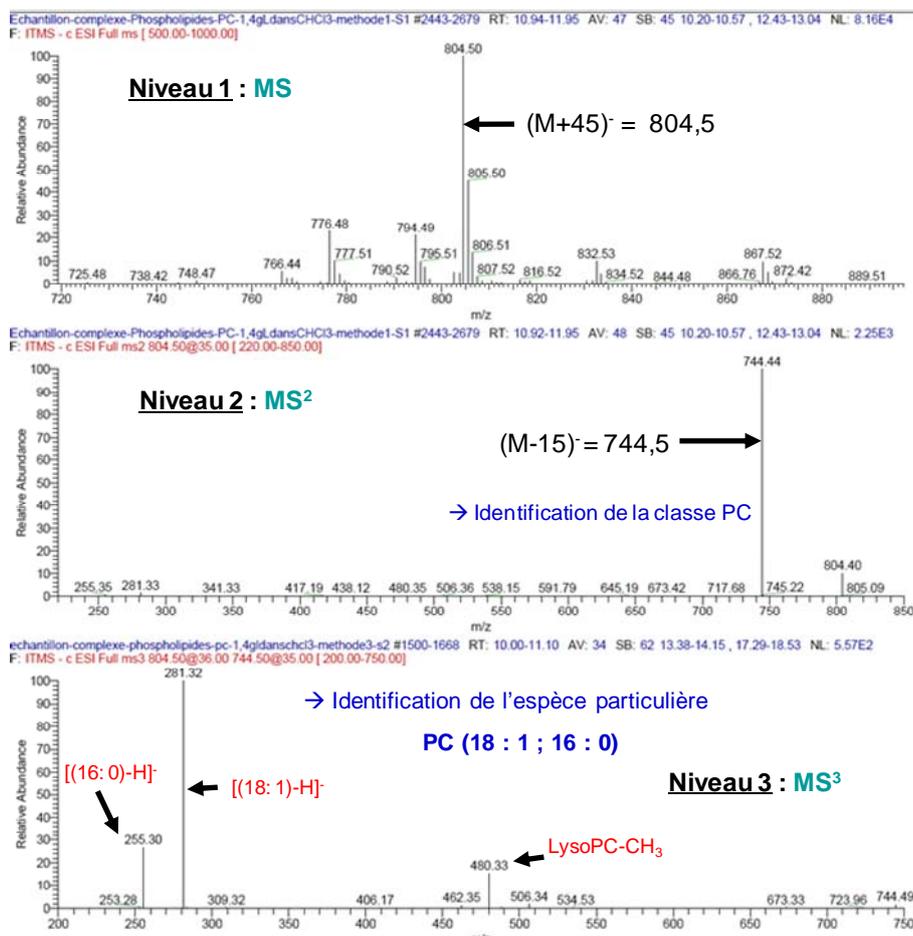


Figure III.5. Spectres MS, MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup> de l'adduit PC  $m/z$  804,5 et détermination de l'espèce moléculaire correspondante par LC-MS.

Concernant la détermination quantitative des espèces moléculaires, il est nécessaire d'admettre que la dissociation induite par collision entraîne la fragmentation totale d'un adduit. Ainsi, l'aire du pic associée à une masse  $m/z$  représente 100% de l'ion fragmenté. Il se peut que pour certaines masses  $m/z$ , plusieurs isomères existent. La quantification de chaque isomère devient alors relative au pourcentage que représente cette masse par rapport aux autres masses. La composition a été déterminée pour la PC de saumon et, à titre comparatif, pour la PC d'œuf et de soja.

### PC saumon

La composition moléculaire détaillée de la PC de saumon est présentée dans le Tableau III.5. Elle a été réalisée sur 3 échantillons de PC purifiée provenant de différents batch. L'ordre des acides gras n'implique pas de stéréospécificité particulière sur le glycérol. Cependant, il a été démontré dans plusieurs études que les phospholipides contenant un acide gras saturé en

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

position *sn*-1 et une chaîne insaturée en position *sn*-2 du glycérol représentaient la classe de lipides membranaires la plus abondante chez les mammifères [76]. Ainsi, on peut admettre d'après les résultats obtenus que les espèces moléculaires majoritaires pour la PC de saumon sont : 1-palmitoyl-2-oleoyl-PC, POPC (33,6%), 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-PC, PDPC (19,4%) et 1-palmitoyl-2-eicosapentaenoyl-PC, PEPC (10,7%). Les espèces combinant AGS/AGPI et AGS/AGMI sont les principales composantes du mélange (40 et 43,5% respectivement). Il est intéressant de noter que des espèces présentant des insaturations à la fois en *sn*-1 et en *sn*-2 représentent 16,7% du total. Les espèces impliquant un AGPI-LC représentent également plus de la moitié de l'ensemble des espèces moléculaires (54,4%), ce qui tend à homogénéiser au maximum la répartition des AGPI-LC au sein du mélange de phospholipides.

Tout comme pour les résultats de la composition en acide gras, certains écart-types importants sont témoins de l'hétérogénéité de la composition initiale de la matière dans le temps.

Tableau III.5. Composition moléculaire de la PC de saumon.

Ion précurseur <i>m/z</i>	Couple d'acides gras	% relatif
732	16:0/16:1	4,5 ± 0,5
	14:0/18:1	2,1 ± 0,1
758	16:0/18:2	2,1 ± 2,0
	16:1/18:1	2,9 ± 0,7
760	16:0/18:1	33,6 ± 2,7
780	16:0/20:5	10,7 ± 2,7
792	15:0/22:6	6,2 ± 1,3
804	16:1/22:6	0,8 ± 0,5
	18:2/20:5	0,4 ± 0,2
806	16:0/22:6	19,4 ± 4,1
	18:1/20:5	2,7 ± 0,5
826	20:5/20:5	2,2 ± 1,3
828	18:3/22:6	1,1 ± 0,5
	20:4/20:5	0,5 ± 0,4
832	18:1/22:6	3,2 ± 0,5
	18:2/22:5	0,3 ± 0,1
834	18:0/22:6	1,1 ± 0,2
	18:1/22:5	0,8 ± 0,2
852	20:5/22:6	3,2 ± 0,6
878	22:6/22:6	2,1 ± 1,2
$\Sigma$ AGS/AGS		0 ± 0
$\Sigma$ AGS/AGPI		40,0 ± 3,3
$\Sigma$ AGS/AGMI		43,5 ± 2,1
$\Sigma$ AGMI/AGPI		8,0 ± 0,9

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

$\Sigma$  di-AGPI

$8.7 \pm 4.5$

#### *PC œuf*

Les compositions moléculaires pour la PC d'œuf et de soja ont été réalisées à partir de standards. Par rapport à la PC de saumon, la détermination de leur composition en acides gras totaux a présenté un écart-type très faible ( $\pm 0,2\%$ ), correspondant essentiellement à la répétabilité de la méthode (la variabilité liée à la nature de l'échantillon étant considérée comme nulle). On estime que la variabilité de l'appareil de mesure pour la LC-MS est également quasi-nulle c'est pourquoi pour les deux standards, les résultats correspondent à un seul essai.

Pour la PC d'œuf, l'espèce moléculaire majoritaire est le POPC à 49,3% (Tableau III.6). Sa composition est simple puisque la quasi-totalité de ses espèces moléculaires implique un couple AGS/AGMI ou AGS/AGPI.

Les résultats obtenus ici correspondent parfaitement avec ceux obtenus par Quinn et *al.* [186] où les espèces majoritaires sont le 16:0/18:1-PC à 52,4%, le 16:0/18:0-PC à 17%, le 18:0/18:2-PC à 11,3% et le 18:0/18:1-PC à 10,5%.

Tableau III.6. Composition moléculaire de la PC d'œuf.

Ion précurseur <i>m/z</i>	Couple d'acides gras	% relatif
734	16:0/16:0	3.0
758	16:0/18:2	16.2
760	16:0/18:1	49.3
782	16:0/20:4	0.5
	18:2/18:2	0.3
784	18:1/18:2	2.4
786	18:0/18:2	8.2
788	18:0/18:1	13.1
808	16:0/22:5	0.2
	18:1/20:4	0.1
810	18:0/20:4	5.4
834	18:0/22:6	1.2
$\Sigma$ AGS/AGS		3.0
$\Sigma$ AGS/AGPI		73.3
$\Sigma$ AGS/AGMI		24.4
$\Sigma$ AGMI/AGPI		0.5
$\Sigma$ di-AGPI		0.5

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

### *PC soja*

Comme il l'a été présenté dans le Tableau III.5, la PC de soja ne contient pas d'EPA et de DHA. Elle est composée au 2/3 d'acide linoléique (AL) ce qui se reflète dans sa composition moléculaire où 86% des espèces totales contiennent au moins un AL (Tableau III.7). Ainsi, contrairement à la PC de saumon et PC d'œuf, 25% des espèces moléculaires sont des di-AGPI.

Tableau III.7. Composition moléculaire de la PC de soja.

Ion précurseur	Couple d'acides gras	% relatif
734	16:0/16:0	2,3
756	16:0/18:3	2,8
758	16:0/18:2	43,3
760	16:0/18:1	8,8
780	18:2/18:3	4,0
782	18:2/18:2	21,7
784	18:1/18:2	4,5
786	18:0/18:2	12,8
$\Sigma$ AGS/AGS		2,3
$\Sigma$ AGS/AGPI		46,1
$\Sigma$ AGS/AGMI		8,8
$\Sigma$ AGMI/AGPI		4,5
$\Sigma$ di-AGPI		25,7

**Partie 2 : Propriétés physiques de la phosphatidylcholine extraite du saumon**

I. Equilibre de phase

1. Microscopie optique

Les systèmes PC – eau contenant de 10 à 60% d’eau ont été observés par microscopie optique avec lumière polarisante à 25 et 65°C. Le principe du microscope à lumière polarisante repose sur la diffusion de la lumière au travers d’un filtre particulier (polarisant) qui ne lui permet alors de vibrer que dans une seule direction. En présence d’un cristal, la lumière le traversant n’aura pas la même vitesse suivant la direction de l’observation. Le filtre analyseur placé après l’échantillon sélectionne à nouveau les rayons lumineux selon leur polarisation. En fonction de la nature des cristaux (le changement de vitesse de la lumière à la rencontre des cristaux), ceux-ci apparaissent plus ou moins lumineux. Ainsi, des structures différentes peuvent être différenciées par microscopie polarisante puisque chaque phase sera associée à un « motif » caractéristique apparaissant au microscope [187].

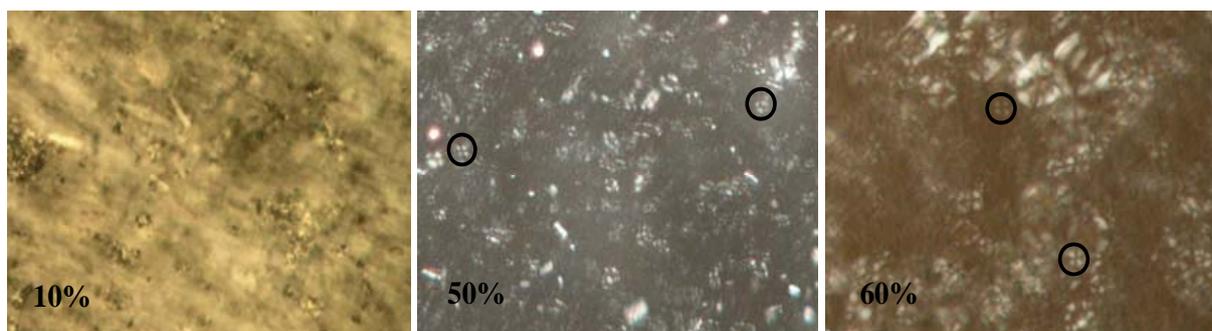


Figure 3III.6. Observations au microscope polarisant des systèmes PC saumon – eau à 10, 50 et 60% d’eau et à 22°C. Les cercles entourent les motifs caractéristiques observés en phase lamellaire (x 40)

A 25°C et à 10% d’eau, aucun motif particulier n’est observé ce qui sous-entend que le système ne présente pas de structure ordonnée particulière. A partir de 20% d’eau, des structures dites « en trèfles à quatre feuilles » apparaissent, caractéristiques de la phase lamellaire. Celles-ci restent présentes avec l’augmentation de la teneur en eau dans les

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

systèmes et sont présentées pour les échantillons à 50 et 60% d'eau (Fig. III.6). Aucun autre motif particulier n'est observé ce qui nous laisse supposer que les échantillons ne présentent pas une autre phase qui coexisterait avec la phase lamellaire.

A 65°C, les mêmes résultats ont été observés à savoir, une structure lamellaire à partir de 20% d'eau.

### 2. Diffraction des rayons X

La structure des systèmes PC saumon – eau à différentes concentrations a été étudiée par diffraction des rayons X aux petits angles. Les spectres de Bragg présentant jusqu'à deux pics de réfraction espacés périodiquement sont caractéristiques d'une structure lamellaire décrivant une succession de bicouches séparées par un film d'eau (Fig. III.7). Seul le système à 10% d'eau ne présente qu'un seul pic large dont la position et la forme peuvent être le reflet d'une organisation en micelles inverses pour laquelle la distance de répétition représenterait la distance entre deux cœurs de micelles. La distance de répétition  $d$  est déterminée à partir du premier pic  $q_0$  selon la formule  $d = 2\pi/q_0$  développée de la loi de Bragg, puisque  $q_0 = (4\pi \sin\theta) / \lambda$  [97]. Celle-ci varie en fonction de la concentration du système. Au fur et mesure que la teneur en eau augmente dans le système, des distances de plus en plus grandes sont observées pour des  $q$  de plus en plus faibles. Avec l'augmentation de l'hydratation du système, on observe également un élargissement des pics de Bragg et une disparition progressive du second pic qui, à partir de 50% d'eau, ne se manifeste plus que par un épaulement. Ce phénomène est caractéristique d'une diminution de l'organisation du système aux grandes distances. En effet, lorsque les bicouches en phase  $L_\alpha$  sont saturées en eau, celles-ci sont soumises à de fortes fluctuations. Ces fluctuations dégradent l'intensité des pics de diffraction d'ordre élevé, ce qui peut compliquer l'analyse [102], [103]. De plus, il a été suggéré par des études antérieures sur des PC en phase  $L_\alpha$  que seules les 15 premières molécules d'eau étaient incorporées de manière homogène [101]. Lorsque de l'eau est ensuite ajoutée, celle-ci aurait tendance à former des poches d'eau autour et au centre des vésicules multilamellaires.

Peu de résultats récents sont disponibles dans la littérature concernant l'influence du taux d'hydratation sur la détermination des spectres de diffraction de rayons X d'échantillons de PC d'origine naturelle, ou contenant plusieurs espèces PC. A notre connaissance, il n'existe aucune mesure similaire pour un PC naturel enrichi en AGPI-LC. Cependant, pour la PC

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

extraite d'œuf, on retrouve des études structurales en fonction de la concentration en lipides [10], [188], [189], [107]. Balgavy et ses collaborateurs [106] ont étudié la structure de liposomes uni- et multilamellaires, où deux spectres SAXS de pics de Bragg en fonction du taux d'hydratation sont donnés : le premier à faible taux (3,5 molécules d'eau par lipide) et le second à saturation d'eau (31 molécules d'eau par lipide). Contrairement à ce qui est obtenu ici, le spectre à faible taux d'hydratation présente une multitude de pics pointus, dont l'allure est caractéristique d'une structure ordonnée de type lamellaire.

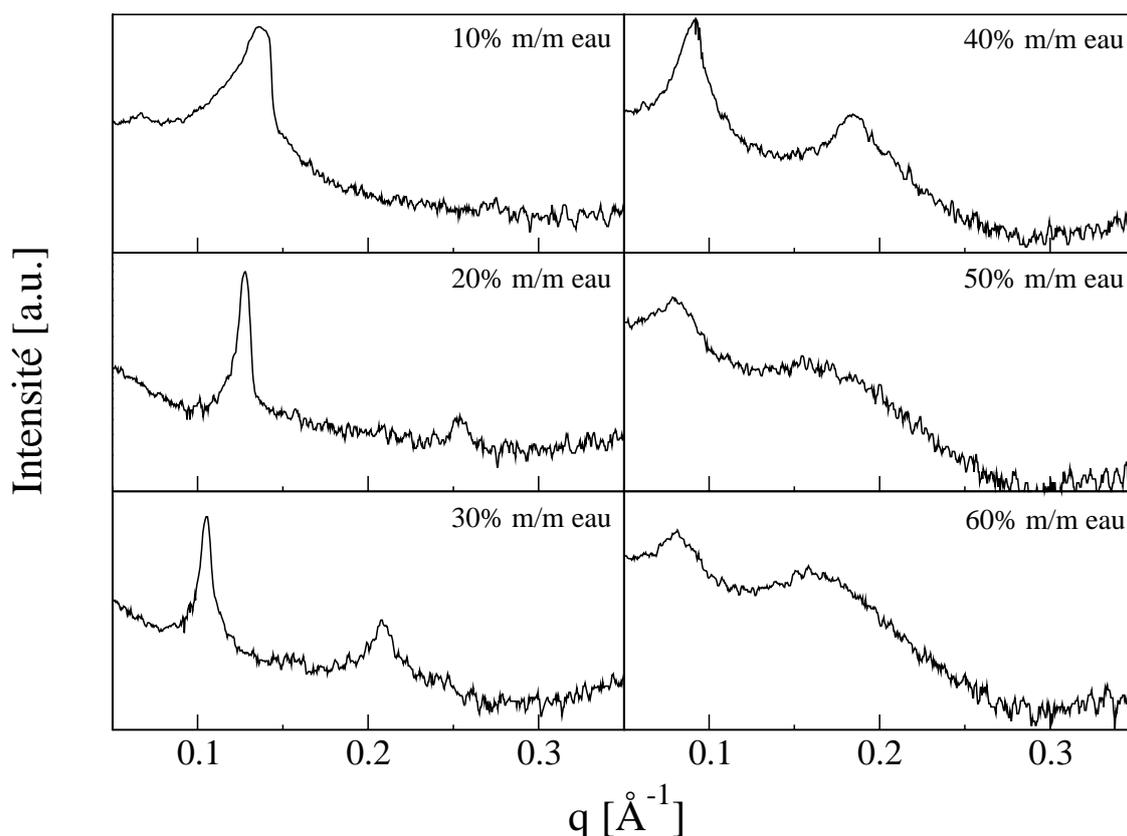


Figure III.7. Spectres de pics de Bragg obtenus par diffraction des rayons X aux petits angles sur l'échantillon de PC saumon en fonction du degré d'hydratation. Mesures réalisées à 25°C. L'échantillon correspond à des multicouches non orientées.

### 3. Analyse thermique différentielle

L'analyse thermique différentielle (ou DSC pour Differential Scanning Calorimetry) est une méthode pouvant mesurer les échanges de chaleur apparaissant lors d'altérations structurales comme la consommation de chaleur durant le processus de fusion ou la libération de chaleur durant la cristallisation. Il devient alors possible de tirer des conclusions sur les propriétés

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

physiques d'un échantillon [8]. Cependant, il est important de garder à l'esprit que bien que la DSC puisse identifier et quantifier des événements thermiques mêmes mineurs dans un échantillon en fonction de la sensibilité de l'appareil de mesure bien sur, cette technique n'explique pas directement la cause de l'évènement. C'est pourquoi, il est nécessaire d'utiliser des méthodes complémentaires telles que les observations microscopiques et la diffraction de rayons X afin d'expliquer la nature exactes des transitions thermiques.

L'étude de l'état physique des systèmes PC – eau par la transformation des endothermes lors du chauffage des échantillons a été réalisée pour la PC de saumon, d'œuf et de soja pour différentes teneurs en eau. Les données dérivant des endothermes pour les trois PC sont présentées dans les Tableau III.8. La température de transition de phase,  $T_m$ , dépend de plusieurs facteurs tels que la charge électrique des têtes polaires, la longueur et la quantité d'insaturations des chaînes hydrocarbonées, le degré d'hydratation ainsi que d'autres facteurs environnementaux [155]. Dans notre cas, la composition des chaînes hydrocarbonées et le degré d'hydratation varient entre les échantillons. C'est donc sur ces points que portera l'analyse des résultats.

#### *Effet de l'hydratation des bicouches sur $T_m$*

Pour la PC de saumon, la température de fusion des chaînes acyles varie de  $3,8^\circ\text{C}$  en conditions anhydre à  $-3,1^\circ\text{C}$  pour un taux d'hydratation de 28 molécules d'eau par lipide. Il semble que les premières molécules d'eau ajoutées au système tendent d'abord à diminuer  $T_m$  avant de l'augmenter progressivement avec l'hydratation. Un comportement similaire est observé pour les deux autres PC avec une diminution de  $T_m$  qui atteint sa valeur la plus basse à 4,5 et 10 molécules d'eau par lipide pour la PC de soja et d'œuf respectivement. A faible teneur en eau ( $\alpha \leq 5$ ), il a été difficile pour les trois PC étudiées ici de localiser précisément le pic de transition de phase et l'enthalpie correspondante. Lorsque les systèmes arrivent à l'état pleinement hydraté ( $\alpha \geq 25$  molécules d'eau par lipide), il n'y a pas de différence significative pour  $T_m$  entre les trois PC.

Concernant la PC d'œuf, un comportement particulier apparaît. En effet, au-delà de 10 molécules d'eau par lipide, la fusion des chaînes acyles atteint son minimum à  $\sim -4^\circ\text{C}$  et l'addition d'eau supplémentaire dans le milieu n'a plus de conséquence sur  $T_m$ . Au contraire, il semble qu'à des hydratations plus élevées, un deuxième pic de fusion apparaisse, tout d'abord sous l'aspect d'un épaulement, avant de devenir plus prononcé. Ce dernier

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

correspond à une seconde transition qui est due à la fusion des cristaux d'eau. Nous pouvons d'autre part émettre l'hypothèse que les pics de transitions causés par la fusion des cristaux d'eau et du pic de fusion des chaînes acyles pour la PC de saumon et de soja soient si proches que les deux événements apparaissent fusionnés. Cette seconde hypothèse semble raisonnable puisqu'un léger épaulement est observé pour la PC de saumon autour de  $-18^{\circ}\text{C}$  pour  $\alpha \geq 22$  molécules d'eau par lipide. Des comportements similaires de transition de phase multiples de systèmes PL-eau ont été observés que ce soit pour des PC d'origine synthétique [190], [191] ou d'origine naturelle [192]. Pour la PC d'œuf, on peut même émettre l'hypothèse que lorsque  $\alpha < 10$  molécules d'eau par lipide, seuil correspondant à l'apparition du pic de fusion des cristaux d'eau, les molécules d'eau entourant la PC constituent la monocouche d'eau empêchant cette dernière de geler. Cette hypothèse est soutenue par Wang et *al.* qui ont corrélé la variation d'enthalpie totale lors du processus de fusion de bicouches de DMPC (1,2-dimiristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) à la teneur en eau des bicouches et ont montré que le DMPC était entouré de 7 molécules d'eau par lipide formant une monocouche d'eau qui ne peut pas geler [193].

La transition de phase pour les phospholipides en excès d'eau, c'est-à-dire à l'état de dispersion de multicouches dans l'eau, a été étudiée de manière considérable (voir [81] pour une revue exhaustive). De même que pour le présent travail, des équipes de chercheurs se sont intéressés à l'influence du taux d'hydratation sur les transitions de phase par DSC, que ce soit pour des PC d'origine synthétique tels que le DMPC et DLPC (1,2-dilaureoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) [194], ou le SPDC et le POPC [121], [195]. Toutes les PC étudiées semblent se comporter de la même manière, à savoir qu'une diminution de  $T_m$  est observée avec l'augmentation de l'hydratation. Cependant, la différence principale entre ces PC synthétiques et la PC de saumon ou de soja semble être une température de transition de phase très élevée pour les premières lorsqu'elles sont à l'état anhydre. En effet, pour le cas de POPC par exemple, la température de début de transition ( $T_{\text{début}}$ ) passe de  $62^{\circ}\text{C}$  l'état anhydre pour se stabiliser à  $-2^{\circ}\text{C}$  à partir de 15 molécules d'eau par lipide [195]. Ainsi, lorsque les PC sont en présence d'un excès d'eau, elles adoptent un comportement similaire où  $T_m$  se rapproche de  $0^{\circ}\text{C}$ .

#### *Effet de la composition hétérogène des PC naturels sur $T_m$*

Les PC d'origine naturelle sont composées de mélange de molécules avec des acides gras aux longueurs de chaîne et insaturations pouvant fortement varier (voir Tableaux III.5, III.6 et

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

III.7). De ce fait, l'étude de la transition de phase d'une PC naturelle donne lieu à des plages de transition faiblement définies. O'Neill a notamment étudié la transition de phase de plusieurs vésicules de phospholipides issus de membranes mitochondriales de soja et n'est pas parvenu à distinguer un pic de transition bien défini [196].

Des études antérieures sur l'effet des insaturations en position *sn-2* de plusieurs phospholipides en excès d'eau sur leur température de transition a démontré que  $T_m$  atteint son minimum lorsque le nombre de double liaison est de 2 [7]. Une augmentation du nombre d'insaturations de 2 à 6 doubles liaisons entraîne une légère augmentation de  $T_m$ . C'est pourquoi en excès d'eau, la composition spécifique de la PC de saumon riche en AGPI-LC n'influe pas de manière significative sur  $T_m$ , en comparaison avec les PC d'œuf et de soja présentant également des teneurs élevées en AGPI.

Contrairement à la PC d'œuf, les PC de saumon et de soja ne présentent qu'un pic de fusion, significatif d'une seule transition de phase même aux taux d'hydratation les plus élevés. On en déduit qu'il n'y a donc pas de séparation de phase en domaines à l'intérieur des bicouches dans la PC de saumon malgré la présence des AGPI-LC. Or, il a été montré que des mélanges de phospholipides ayant des  $T_m$  bien différentes n'existent pas sous la forme d'une phase bien homogène mais se présentent plus sous la forme d'un mélange où coexistent une phase gel et une phase cristal-liquide [197]. On retrouve notamment l'exemple avec un mélange de DPPC et SDPC à plusieurs ratios différents où l'on retrouve l'existence de micro-domaines où coexistent des phases gel et cristal-liquide [17].

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau III.8. Influence de la teneur en eau sur la température de transition de phase et l'enthalpie associée pour différentes muticouches de PC.

PC	$\alpha$ (molécules d'eau/lip)	$T_{\text{début}}$ (°C)	$T_{\text{m pic1}}$ (°C)	$T_{\text{m pic2}}$ (°C)	$T_{\text{fin}}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
saumon	0	-0.2	3.8	-	n.d.	n.d.
	4.5	-43.4	-24.9	-	-20.0	4.6
	10	-37.7	-18.0	-	-14.4	8.9
	15	-36.5	-17.3	-	-13.5	15.1
	22	-20.7	-11	-	-8.1	13.0
	28	-9.8	-3.1	-	-0.5	28.1
soja	0	n.d.	-7.3	8	n.d.	n.d.
	4.5	-19.7	-26.2	-	-14.9	2.4
	10	-17.2	-6.7	-	-3.5	11.6
	15	-19.5	-9.0	-	-5.2	7.3
	22	-0.3	2.5	-	4.3	10.3
	28	0.8	4.4	-	6.8	32.3
œuf	0	26.2	33.9	-	38.2	8.3
	4.5	-3.1	7.7	-	-3.1	9.0
	10	-16.2	-7.3	-	-3.4	6.8
	15	-11.1	-4.2	1.0	3.0	27.3
	22	-16.7	-4.7	1.7	3.2	40.0
	28	-17.1	-4.1	3.9	5.8	40.0

### *Approche thermodynamique de la transition de phase*

L'évolution de l'enthalpie  $\Delta H$  de transition de phase en fonction de la teneur en eau est similaire pour les trois PC : elle augmente avec l'hydratation. Il est bon de noter que  $\Delta H$  résulte de la contribution apportée par la transition de phase des phospholipides et de l'eau et peut donc s'écrire :

$$\Delta H = \int_{T_i}^{T_f} n_w c_{pw} dT + \int_{T'_i}^{T'_f} n_L c_{pL} dT \quad \text{Équation 17}$$

où  $T_i$ ,  $T'_i$ ,  $T_f$ ,  $T'_f$  sont les températures de transition,  $n_w$  et  $n_L$  sont les nombres de moles et  $c_{pw}$  et  $c_{pL}$  sont les chaleurs spécifiques de l'eau et des phospholipides respectivement.

Lorsque la teneur en eau dans le système est faible, on peut s'attendre à ne pas trouver de pic résultant de la transition de phase de l'eau. Ainsi,  $\Delta H$  est principalement liée de la variation d'enthalpie de la transition de phase de la PC. La contribution de la fusion de l'eau pour  $\Delta H$

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

apparaît seulement à partir de 10 molécules d'eau par lipide pour le DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) [191]. Dans notre étude, ce phénomène apparaît à partir de 15 molécules d'eau par lipides pour la PC d'œuf. De plus, plus la proportion d'eau augmente dans le système, plus  $\Delta H$  augmente également. Pour les fortes teneurs en eau (quand  $n_w \gg n_L$ ), ceci implique que la contribution de l'eau est plus importante que celle de la PC puisque  $c_{pw} \approx c_{pL}$  (4,18 J.K<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> pour l'eau et 2,22 J.K<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> pour le DPPC [198]) et  $\Delta H \approx n_w c_{pw} \Delta T$ .

### 4. Diagramme de phase binaire PC-eau

Pour décrire la structure d'un système lipide-eau, il est commode de se référer à un diagramme où les domaines d'existence des différentes phases sont repérés en fonction de la température et de la concentration. Cette représentation permet d'indiquer clairement le nombre et la nature de ces phases. Les observations au microscope polarisant, les résultats de l'étude calorimétrique de la transition de phase et la diffraction des rayons X ont été utilisés pour réaliser ce diagramme de phase PC de saumon –eau (Fig. III.8).

Le but n'était pas de déterminer avec précision la position des limites exactes entre les différentes phases ni d'explorer avec détail les régions où plusieurs phases coexistent mais de définir le type de phase obtenu dans le domaine d'étude et d'application – c'est-à-dire en excès d'eau et entre 25 et 40°C. Dans ce domaine, la PC de saumon est en phase lamellaire  $L_\alpha$  avec les chaînes hydrocarbonées fluides.

La diffraction des rayons X a permis de fixer la limite entre la phase micellaire et la phase lamellaire, ainsi qu'entre la phase lamellaire pure et la phase lamellaire dispersée. Les résultats de DSC ont permis de tracer la limite de  $T_m$  en fonction du taux d'hydratation et ainsi confirmer qu'en phase lamellaire, aucun déphasage n'était observé jusqu'à 60°C indépendamment du taux d'hydratation. Cependant, la microscopie optique et la diffraction des rayons n'ont pas été appliquées pour les températures négatives.

La limite entre la phase lamellaire gel et la dispersion de multicouches en excès d'eau n'a pas pu être fixée expérimentalement. Or, il a été montré que la quantité d'eau maximale que peut absorber un phospholipide avant le déphasage dépend de plusieurs paramètres comme le type de tête polaire, l'hétérogénéité des chaînes et le mélange des espèces moléculaires mais également de l'état physique des chaînes carbonées [170]. Une étude similaire sur l'influence de l'hydratation de bicouches POPC sur la température de transition de phase a permis de

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

démontrer que lorsque la PC est en phase gel, la quantité d'eau maximale qui peut être intégrée avant saturation est plus faible que lorsque la PC est en phase liquide crystal ( $L_{\beta}$   $\alpha \sim 9$  et  $L_{\alpha}$   $\alpha \sim 20$  molécules d'eau par lipide) [191].

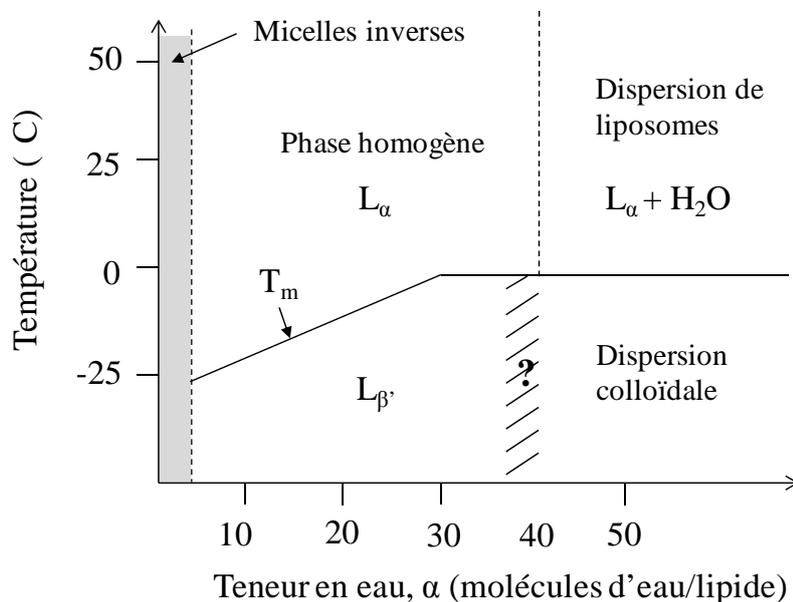


Figure III.8. Diagramme de phase du système PC saumon –eau déterminé à partir des résultats expérimentaux. Légende :  $L_{\alpha}$ , phase lamellaire liquide cristalline ;  $L_{\beta}$ , phase lamellaire gel ;  $T_m$ , température de transition de phase. La zone hachurée correspond à la limite théorique séparant la phase gel d'une dispersion colloïdale en phase gel et l'eau.

### II. Etude structurale des multicouches

#### 1. Evolution de la lamellarité en fonction de l'hydratation

Une fois la structure des phases déterminée dans le domaine d'hydratation d'étude, il est possible de mesurer l'évolution de la lamellarité (la distance de répétition) en fonction du taux d'hydratation et ainsi de déterminer les paramètres structuraux de la PC de saumon.

Comme le montre la Figure III.9,  $d$  varie de 46,9 Å à 80 Å pour des teneurs en eau  $\alpha$  évoluant de 4,6 à 63,5 molécules d'eau par lipide. Cette évolution linéaire de  $d$  en fonction de  $\alpha$  est caractéristique d'un gonflement des multicouches. Un déphasage, caractérisé par un plateau où  $d$  reste constante malgré une augmentation de l'hydratation, est obtenu à partir de 42 molécules d'eau par lipide. Passé ce stade, les molécules d'eau rajoutées par la suite ne viennent plus s'insérer dans le film d'eau entre deux bicouches mais augmentent la phase aqueuse.

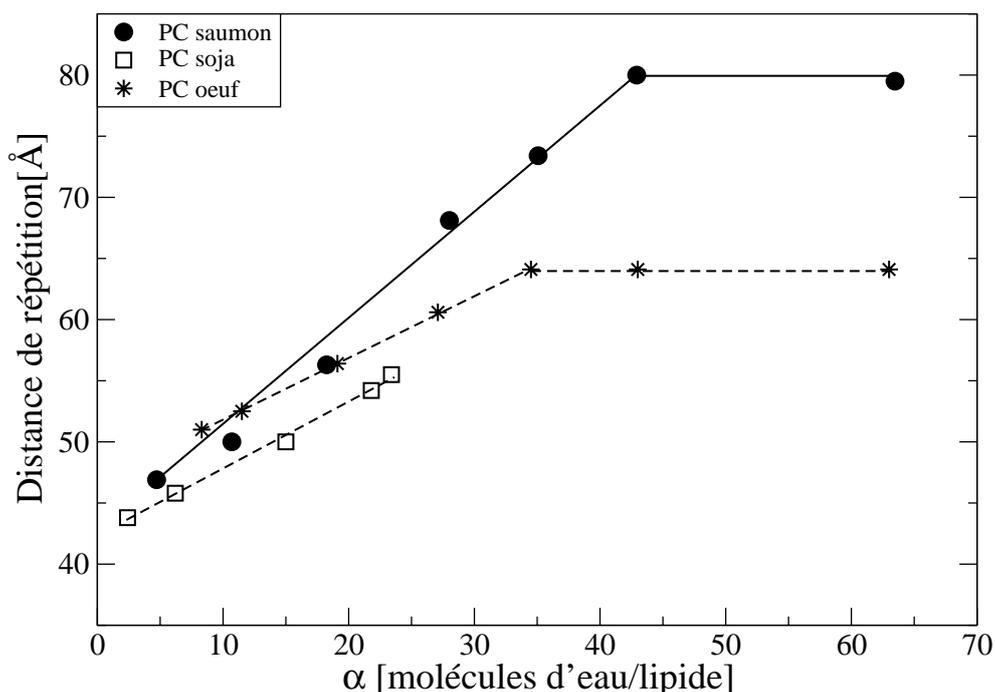


Figure III.9. Distances de répétition pour des multicouches de PC mesurées par diffraction des rayons X pour la PC de saumon, PC de soja et PC d'œuf, en fonction du taux d'hydratation. Les résultats pour la PC d'œuf et de soja proviennent des références [10] et [11] respectivement.

A titre comparatif, la Figure III.9 répertorie également l'évolution de  $d$  en fonction de  $\alpha$  pour les PC d'œuf et de soja, étudiées par Small et *al.* [10] et Bergenstahl et *al.* [11] respectivement. Les deux PC présentent un comportement similaire avec une augmentation de  $d$  avec l'hydratation. Cependant, le gonflement est plus important pour la PC de saumon que pour la PC d'œuf et de soja avec une pente nettement plus importante. Il est également intéressant de noter que le déphasage apparaît plus tôt pour la PC d'œuf à 34,5 molécules d'eau par lipide.

## 2. Surface disponible par tête polaire

Avant le déphasage, la distance de Bragg  $d$  déterminée expérimentalement permet de calculer la surface par tête polaire selon la formule suivante proposée par Luzatti [92] :

$$A = \frac{2 \times V_{PC}}{d \times \Phi_{PC}} \quad \text{Équation 18}$$

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

où  $d$  est la distance de répétition en Å,  $V_{PC}$  est le volume molaire du PC en Å<sup>3</sup> par molécule et  $\phi_{PC}$  est la fraction volumique du PC. Pour les calculs, il est impératif d'avoir la valeur de la masse moléculaire  $M$  de la PC en g/mol ainsi que la densité  $\rho$  en g/cm<sup>3</sup>.  $M$ , estimée à partir de la composition relative en espèces moléculaires donnée dans le Tableau III.6, est établie à 780 g/mol.  $\rho$  n'a pas été déterminé expérimentalement, il a été décidé d'utiliser la valeur de la densité anhydre de la PC d'œuf qui est de 1,02g/cm<sup>3</sup> [10] car c'est également un mélange de plusieurs espèces moléculaires PC. Nous considérons que la composition moléculaire spécifique de la PC saumon n'affecte que très peu la valeur de la densité. Le volume moléculaire moyen a été calculé comme suit :

$$V_{PC} = 1/\rho \times M/N \times 10^{24} \quad \text{Équation 19}$$

avec  $N$  comme étant le nombre d'Avogadro et  $10^{24}$  le nombre de molécules dans un cm<sup>3</sup>. Pour la PC de saumon, il a été déterminé à 1275 Å<sup>3</sup>/lipide. La fraction volumique de PC dépend de la teneur en eau et est déterminée par :

$$\phi_{PC} = ((100 - m_w)/100)/\rho$$

Équation 20

avec  $m_w$  étant le pourcentage massique en eau dans le système.

L'évolution de la surface par tête polaire,  $A$ , en fonction de la teneur en eau,  $\alpha$ , est présentée en Figure III.10 pour les PC de saumon, d'œuf et de soja. D'emblée on remarque que contrairement à la PC de soja ou d'œuf qui présentent une nette augmentation de la surface par tête polaire avec une augmentation de l'hydratation, la PC de saumon offre une légère variation mais reste globalement constante autour de 64 Å<sup>2</sup>/lipide. Ce résultat semble contraster avec ceux trouvés dans la littérature pour d'autres PC où une augmentation de l'aire par lipide est observée avec l'hydratation [102],[121] mais également lorsque le nombre d'insaturations augmente en position *sn-2* [4]. Ainsi, on s'attendrait à trouver en excès d'eau une aire moyenne par lipide bien supérieure pour la PC de saumon comparée à la PC d'œuf ou de soja.

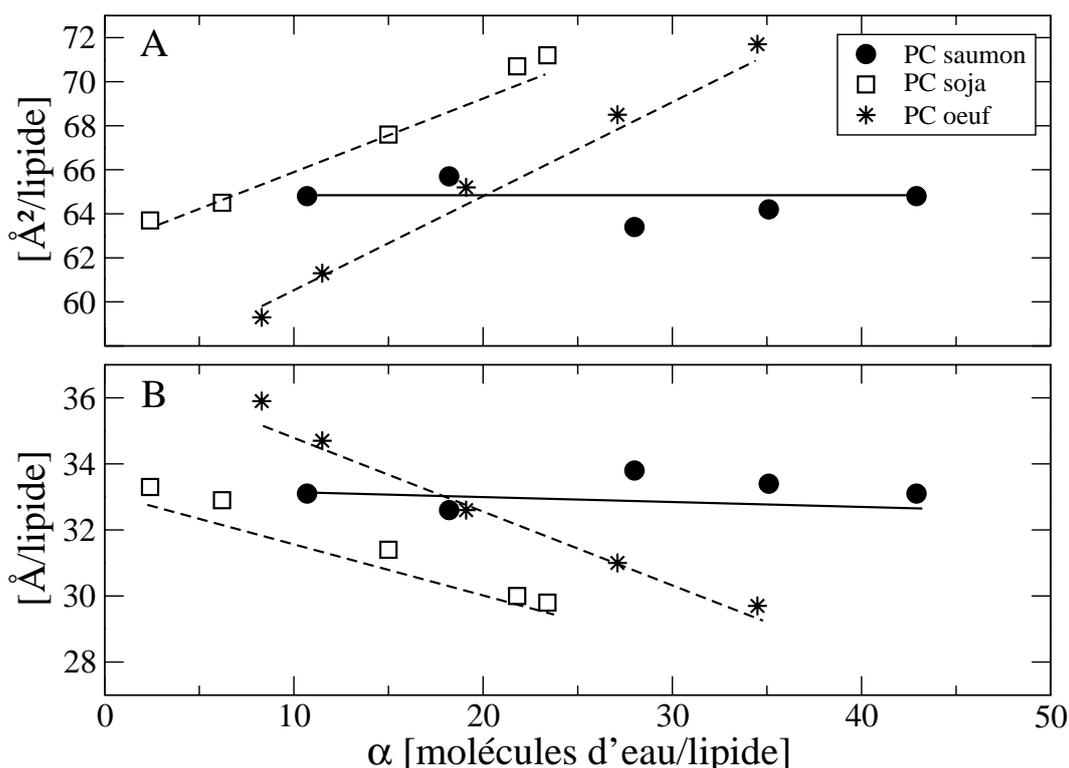


Figure III.10. (A) Aire par lipide calculée à partir des distances de répétitions en fonction du taux d'hydratation pour les PC de saumon, œuf et soja. (B) Distance hydrophobe déterminée à partir de l'aire par lipide en fonction du taux d'hydratation pour les PC de saumon, œuf et soja.

Il a été montré que l'approche de Luzatti manquait de précision dans le calcul de l'aire moléculaire puisqu'il est nécessaire de connaître précisément la concentration en eau dans l'empilement des bicouches. Comme il a été expliqué précédemment, pour des concentrations proches de l'excès en eau, des poches d'eau peuvent se former dans le centre des bicouches et entre les vésicules multilamellaires [101] ce qui tend à surestimer A. Cependant, on s'aperçoit dans la Figure III.10 que la pente de  $d$  est bien plus accentuée pour la PC de saumon que pour les deux autres PC. Ceci démontre que la plupart des molécules d'eau ajoutées durant l'hydratation viennent s'ajouter à l'eau « libre » présente entre les bicouches et, de ce fait, ne participe pas à l'hydratation de la tête polaire.

### 3. Paramètres structuraux de la PC en multicouches

La structure lamellaire des molécules amphiphiles peut être divisée en deux parties : la couche lipidique et le couche aqueuse. L'eau est généralement située complètement à l'extérieur de la

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

couche lipidique et se retrouve donc dans les têtes polaires des molécules amphiphiles. On distingue alors deux zones dans la partie hydrophile où l'eau est située, la zone phosphorylcholine des têtes polaires et la zone dite d'eau libre. Il a été montré que la longueur de la zone phosphorylcholine lorsque ce groupement est complètement étendu est de 8 Å [10]. En prenant en compte d'autres valeurs données par la littérature comme le volume d'une molécule d'eau estimé à 29,9 Å<sup>3</sup> et le volume de la tête polaire de la phosphatidylcholine  $V_{PH}$  à 204 Å<sup>3</sup> [10], il devient alors possible de calculer d'autres paramètres structuraux de la PC de saumon en fonction du taux d'hydratation, qui pourraient ensuite aider à la compréhension de ses propriétés physiques.

Le volume hydrophobe ( $V_{HC}$ ), de 934 Å<sup>3</sup>, est déterminé par la relation suivante :

$$V_{HC} = V_{PC} - V_{PH} \quad \text{Équation 21}$$

La distance du cœur hydrophobe ( $d_{HC}$ ), donné en Å, est déterminée à partir de la surface par tête polaire  $A$  et le volume hydrophobe  $V_{HC}$  par la relation suivante :

$$d_{HC} = 2 \times V_{HC} / A \quad \text{Équation 22}$$

La distance hydrophile ( $d_W$ ), en Å, est donnée par la relation suivante :

$$d_W = d - d_{HC} \quad \text{Équation 23}$$

L'épaisseur de l'eau dite libre ( $d_{Wf}$ ), en Å, s'obtient à partir de la distance hydrophile et de la longueur du groupement phosphorylcholine par :

$$d_{Wf} = d_W - 2 \times 8 \quad \text{Équation 24}$$

Le nombre de molécules d'eau présentes au niveau de chaque tête polaire ( $\alpha_{PH}$ ) est obtenu à partir du volume d'eau au niveau de la tête polaire par :

$$\alpha_{PH} = (A \times 8 - 341) / 29,9 \quad \text{Équation 25}$$

Le volume d'eau pour chaque lipide ( $V_W$ ), en Å<sup>3</sup>, nécessite de connaître en premier lieu le volume total d'un lipide et de l'eau qui l'entoure ( $V_T$ ):

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

$$V_T = V_{PC} / \phi_{PC} \quad \text{Équation 26}$$

$V_W$  est ensuite donné par la relation suivante :

$$V_W = V_T - V_{PC} \quad \text{Équation 27}$$

Le nombre de molécules d'eau par lipide dans la zone d'eau libre ( $\alpha_f$ ) dépend du volume d'eau total pour chaque lipide et du volume d'eau au niveau de la tête polaire. Il est obtenu comme suit :

$$\alpha_f = (V_W - (A \times 8 - 204))/29,9 \quad \text{Équation 28}$$

Une représentation schématique de l'ensemble de ces données est donnée en Figure III.11 les données sont regroupées dans le Tableau III.9. Les résultats sont comparés avec la PC d'œuf, étudiée par Small [10].

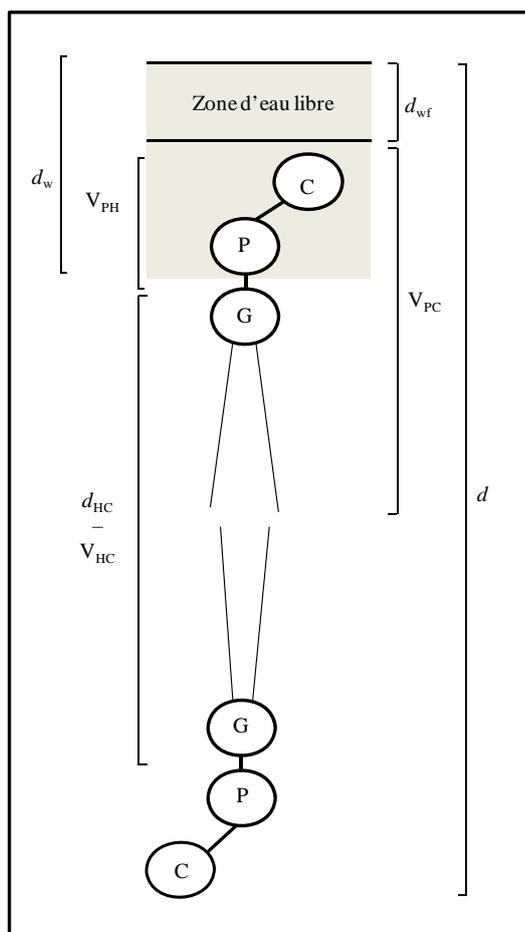


Figure III.11. Représentation schématique montrant l'organisation de deux phospholipides assemblés dans une bicouche illustrant les différents paramètres structuraux :  $d$  est la distance

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

de Bragg,  $d_w$  la distance hydrophile,  $d_{wf}$  la couche d'eau libre,  $d_{HC}$  la distance hydrophobe,  $V_{HC}$  le volume hydrophobe,  $V_{PH}$  le volume de la tête polaire et  $V_{PC}$  le volume molaire.

Tableau III.9. Paramètres structuraux pour la PC de saumon et d'œuf

% eau	$\alpha$	$d$		A		$d_{HC}$	
		saumon	œuf	saumon	œuf	saumon	œuf
10	4,8	46,9					
15	8,3		51,0		59,3		35,8
20	10,7	50,0	52,5	64,8	61,3	33,1	34,7
30	18,2	56,3	56,4	65,7	65,2	32,6	32,6
40	28,4	68,1	60,6	63,4	68,5	33,8	31,0
45	35,1	73,4	64,1	64,2	71,7	33,4	29,6
50	42,9	80,0		64,8		33,1	
60	63,5	79,5					

$\alpha$	$d_w$		$d_{wf}$		$\alpha_{PH}$		$\alpha_f$	
	saumon	œuf	saumon	œuf	saumon	œuf	saumon	œuf
8,3		15,2		0		9,1		0
10,7	16,9	17,8	0,9	1,8	10,5	9,6	1,0	1,9
18,2	23,7	23,6	7,7	7,8	10,7	10,6	8,5	8,5
28,4	34,3	29,6	18,3	13,6	10,1	11,5	19,4	15,6
35,1	40,0	34,5	24,0	18,5	10,3	12,4	25,8	22,2
42,9	46,9		30,9		10,5		33,5	

Les zones grisées n'ont pas été déterminées car les calculs ne sont pas possibles, les systèmes ne se trouvant pas en phase lamellaire.

Tout comme l'évolution de l'aire par lipide en fonction de l'hydratation, la distance hydrophobe  $d_{HC}$  ne subit pas de variation sous l'effet de l'hydratation et reste constante autour de 33 Å. Comparé à la PC d'œuf, on remarque que cette dernière subit une compression des chaînes acyles sous l'effet de l'hydratation qui se traduit par une diminution de  $d_{HC}$  (de 35,8 à 29,6 Å). Cette particularité de la PC de saumon est confirmée par le fait que la quantité de molécules d'eau au niveau des têtes polaires,  $\alpha_{PH}$ , demeure constante malgré l'hydratation (~10,8) alors que pour la PC d'œuf, dans la même gamme d'hydratation,  $\alpha_{PH}$  augmente de 9,1 à 12,4 molécules d'eau par tête polaire. C'est pourquoi pour la PC de saumon, l'aire par lipide reste constante et l'augmentation de l'hydratation est directement observable dans l'augmentation du film d'eau entre les bicouches.

### III. Etude de l'hydratation de la phosphatidylcholine

Les caractéristiques d'hydratation de la PC de saumon ont été étudiées par méthode gravimétrique. A titre comparatif, la PC de soja et la PC d'œuf ont également été étudiées par cette méthode. Les résultats de cette étude seront présentés en trois parties : tout d'abord, la capacité des différentes PC à adsorber de la vapeur d'eau sera mise en avant avec détermination des isothermes de sorption. Puis la modélisation mathématique de ces isothermes va permettre de faire ressortir les paramètres physiques liés à l'hydratation. Enfin, une étude de la cinétique d'adsorption sera réalisée et comparée aux résultats de la littérature en rapport avec les processus de diffusion des molécules d'eau au travers des membranes.

#### 1. Courbes isothermes d'adsorption de vapeur d'eau

A 25°C, les mesures de DSC ont démontré que les PC de saumon, d'œuf et de soja se trouvent au dessus de leur température de transition gel – liquide-cristal et ce, indépendamment de la teneur en eau dans le système. De ce fait, les mesures gravimétriques réalisées à cette température permettent de déterminer les isothermes de sorption à l'état liquide-cristal. Les courbes isothermes de sorption d'eau sont présentées en Figure III.12 et présentent la forme sigmoïdale classique des composés alimentaires partiellement ou totalement amorphes. Une comparaison de ces isothermes montre que lorsque l'humidité relative est inférieure à 60%, l'adsorption des molécules d'eau est relativement faible (< 6 molécules d'eau par lipide), même sur une large plage d'humidité relative pour les trois PC. Lorsque l'humidité relative est élevée (HR > 80%), la PC de saumon adsorbe plus d'eau que les PC d'œuf et de soja. Des travaux antérieurs ont également souligné la différence de quantité d'eau adsorbée pour des phospholipides portant la même tête polaire mais dont le nombre d'insaturations entre les chaînes acyles variait, avec une augmentation de l'adsorption de l'eau quand le nombre d'insaturations augmente [199]. Les conclusions de cette étude font apparaître la relation entre le nombre d'insaturations et la surface disponible par tête polaire, celle-ci s'accroissant avec l'insaturation des chaînes, augmentant ainsi le volume disponible pour l'adsorption des molécules d'eau.

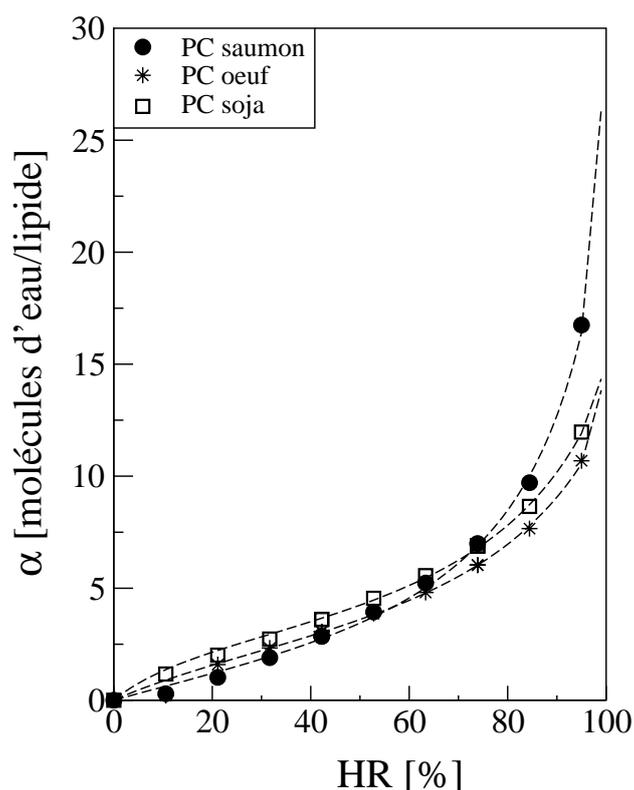


Figure III.12. Isothermes d'adsorption de vapeur d'eau pour les PC de saumon, œuf et soja en molécules d'eau adsorbée par lipide en fonction de l'humidité relative (H.R.) environnante. Chaque isotherme correspond à une moyenne de trois essais. Par souci de clarté, les écarts-types ne sont pas représentés.

## 2. Modélisation mathématique des isothermes

Les isothermes d'adsorption ont été modélisées à l'aide de plusieurs modèles mathématiques : le BET, GAB et TSS. Chaque modèle a été utilisé dans une gamme d'humidité relative lui correspondant : le BET pour HR comprise entre 0 et 40%, le GAB pour HR comprise entre 0 et 80% et le TSS pour HR comprise entre 0 et 99%. Les modèles mathématiques ont beaucoup été utilisés pour modéliser les isothermes de sorption dans le domaine alimentaire où on en rapporte plus de 200 [158]

Les paramètres obtenus par chaque modèle pour les PC de saumon, œuf et soja sont donnés dans le Tableau III.10. On peut noter en premier lieu que les trois modèles ont des coefficients de corrélation proches de 1, quel que soit l'échantillon testé. On en déduit que dans la gamme dans laquelle ils ont été utilisés, ils parviennent parfaitement à modéliser les isothermes. Cependant, si on prend en compte les paramètres physiques qui se dégagent des différents modèles et notamment les valeurs de la monocouche d'eau au niveau des têtes polaires  $\alpha_0$ , le

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

modèle GAB donnent des valeurs peu pertinentes puisque très différentes des 2 autres modèles. Il est donc préférable de ne pas utiliser ce modèle pour la description de nos résultats expérimentaux.

Le modèle BET a déjà été utilisé auparavant pour l'étude de l'hydratation des phospholipides [155], [200]. Une valeur de 2 molécules d'eau par lipide avait alors été trouvée pour  $\alpha_0$  pour la PC d'œuf [199], ce qui est similaire au résultat trouvé ici (2,44). Avec ce modèle, des différences significatives apparaissent au niveau de  $\alpha_0$  en fonction du type d'échantillon. En effet, on note un  $\alpha_0$  pour la PC de saumon plus élevée que pour la PC de soja et d'œuf. Etant donné que les trois types de phospholipides présentent la même tête polaire, cette différence de comportement observée ne peut être le résultat que de la composition en acides gras, plus particulièrement des AGPI-LC de la PC de saumon. En effet, Jendrasiak [155] a montré que le groupement choline dans la phosphatidylcholine peut contrôler la force et la quantité de l'eau liée aux PC (comparé à la PE ou la monométhyle PE d'œuf) alors que les insaturations des chaînes acyles modulent la quantité mais pas nécessairement la nature de l'eau liée.

Le modèle BET permet également, selon le type d'isotherme obtenu et la forme que celui-ci adopte pour HR < 50%, de déterminer le type d'interaction entre les molécules d'eau et les têtes polaires [200]. Ici, les trois PC montrent un comportement de type isotherme II, avec une forte adhésion des molécules d'eau aux têtes polaires. Ces résultats sont en accord avec ceux de Jendrasiak et *al.* qui laissent à supposer que la forte interaction se fait au niveau des atomes d'oxygène du squelette glycérol puisqu'il compare les isothermes de PC et de SM et démontre que la SM présente une faible interaction avec les molécules d'eau.

Tableau III.10. Paramètres obtenus après modélisation des isothermes de sorption pour les PC de saumon, d'œuf et de soja en utilisant les modèles BET, GAB et TSS. Les résultats correspondent à une moyenne sur 3 essais présentés avec leurs écarts-types.

Modèle	PC	$\alpha_0$	C	K	$h_{TSS}$	R <sup>2</sup>
BET	saumon	3,09±0,4	1,43±0,4	-	-	0,993
	soja	2,26±0,1	9,14±2,3	-	-	0,992
	œuf	2,44±0,4	3,13±1,6	-	-	0,967
GAB	saumon	0,09±0,1	11,1±0,3	1,6±0.1	-	0,998
	soja	0,83±0,1	9,02±0,2	1,4±0.1	-	0,998
	œuf	0,50±0,5	8,41±0,8	1,4±0.3	-	0,978
TSS	saumon	3,03±0,3	1,51± 0,1	0,87± 0,0	1,51± 0.4	0,998
	soja	3,09±0,1	2,53± 0,3	0,79± 0,0	2,93± 0.2	0,998
	œuf	3,06±0,4	2,24± 0,5	0,77± 0,0	1,84± 0.8	0,995

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Afin de prédire les valeurs d'adsorption d'eau pour des HR proches de 100%, le modèle TSS a été utilisé. En effet, de manière expérimentale il n'est pas possible de dépasser des valeurs d'HR de 95% puisque le système ne peut plus se stabiliser et atteindre l'équilibre, étant donné qu'on se rapproche des conditions de l'eau liquide (HR proche de 100% correspondant à l'eau pure). Or la détermination de la quantité d'eau maximale que peut adsorber un composé amphiphile représente la mesure de la force d'hydratation des bicouches [170]. Ainsi, pour HR = 99%, le modèle TSS indique les valeurs maximales que peuvent adsorber chaque PC, soit 26,3, 13,8 et 14 molécules d'eau par lipide, pour les PC de saumon, d'œuf et de soja respectivement. Pour la PC d'œuf, cette valeur est similaire à celle obtenue par Jendrasiak et Smith [200] qui ont utilisé le modèle BET et ont trouvé 14,3 molécules d'eau par lipide.

Similairement aux résultats trouvés en diffraction des rayons X où les multicouches de PC de saumon pouvaient absorber des quantités d'eau supérieures à celles de PC d'œuf avant le déphasage, la PC de saumon peut également adsorber des quantités de vapeur d'eau supérieures aux PC de soja et d'œuf. Les valeurs retrouvées dans ce cas là sont nettement inférieures lorsqu'on est en condition d'eau liquide, c'est pourquoi il n'est pas possible de comparer directement les valeurs entre les deux méthodes de mesure.

### 3. Cinétique d'hydratation

La Fig. III.12 représente les cinétiques d'adsorption pour la PC de saumon, de soja et d'œuf. Les valeurs sont rapportées en mg de vapeur d'eau adsorbée par rapport à la PC anhydre en fonction du temps. Pour les premières molécules d'eau, la cinétique d'adsorption dépend essentiellement de la façon dont a été déposé l'échantillon, notamment l'épaisseur et l'homogénéité du film de phospholipides dans la cuve, plus que des caractéristiques intrinsèques de l'échantillon. C'est pourquoi il peut être délicat de dégager des conclusions quant à la durée des premières étapes avant d'atteindre l'équilibre où on remarque que les écarts-types sont assez importants (insert Fig. III.13). En revanche, la PC de saumon se démarque des deux autres échantillons lors de la dernière étape (entre 84 et 95% d'humidité relative) où, du fait des quantités d'eau adsorbées bien supérieures aux deux autres PC, la durée de l'étape est significativement supérieure.

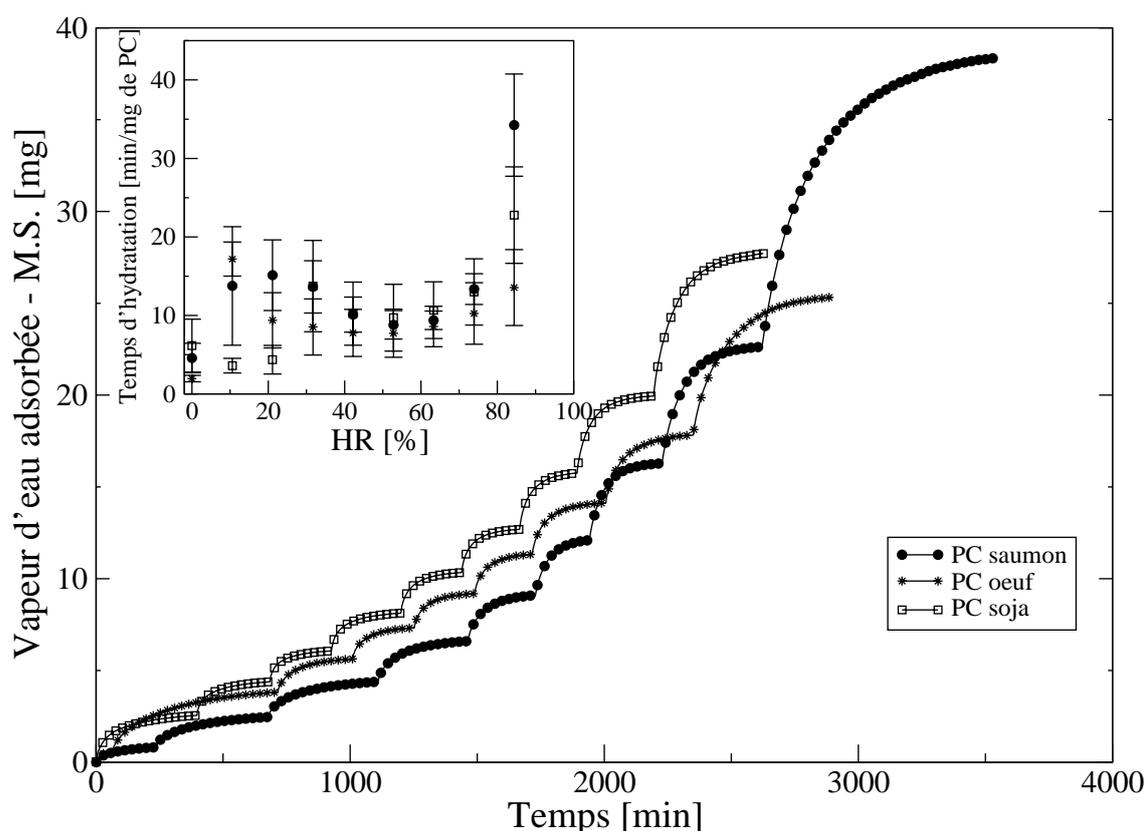


Figure III.13. Quantité de vapeur d'eau adsorbée par la matière sèche (M.S.) en fonction du temps en mg eau/mg de PC anhydre pour les PC de saumon, œuf et soja. Les mesures ont été réalisées à 25°C et correspondent à un profil standard pour chaque échantillon. Insert en haut à gauche : Temps nécessaires pour atteindre l'équilibre à chaque palier d'hydratation ramené en minutes/mg de PC pour les PC de saumon, œuf et soja. Les résultats correspondent à une moyenne de trois essais et sont présentés avec les écart-types.

La détermination des vitesses initiales à différents stades dans un même palier d'hydratation a été réalisée en prenant les tangentes aux courbes d'hydratation à 0, 25, 50 et 95% d'hydratation (Fig. III.14). La vitesse initiale à 0% correspond à la vitesse de sorption en surface, les vitesses initiales entre 10 et 80% correspondent aux vitesses de capillarité et la vitesse initiale à 95% à la vitesse de diffusion à travers un film.

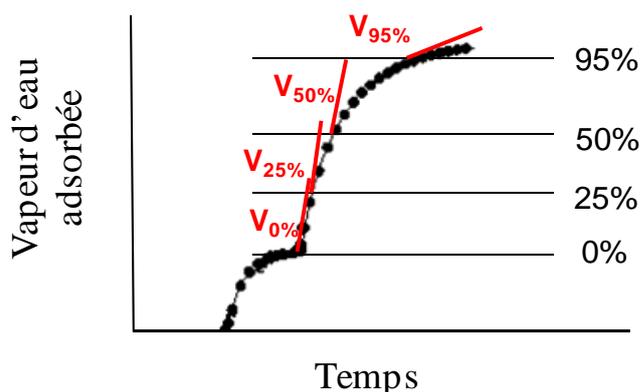


Figure III.14. Représentation schématique de la détermination des vitesses initiales à 0, 25, 50 et 95% d'hydratation au sein d'une même étape.

Les résultats pour la PC de saumon sont présentés en Figure III.15 et la comparaison avec la PC d'œuf et de soja dans le Tableau III.11. Plusieurs commentaires ressortent de l'analyse des vitesses initiales où les trois PC abordent un comportement similaire.

Tout d'abord, on remarque que les écarts-types importants ne permettent pas de différencier les vitesses initiales pour des paliers d'hydratation successifs. En revanche, on dénote une augmentation progressive des vitesses lorsque l'hygrométrie augmente, significatif de la facilité avec laquelle les molécules d'eau peuvent s'adsorber à l'intérieur des multicouches. Ainsi, la vitesse à initiale à 0% au palier 1 ( $0 < HR < 10,6\%$ ) est nettement inférieure à celle du dernier palier ( $84,4 < HR < 95\%$ ).

Par ailleurs, les vitesses initiales décroissent au fur et à mesure que l'échantillon arrive à l'équilibre. Ainsi, pour la PC de saumon, les vitesses de sorption vont de 2,7 à 10,3 molécules d'eau/lipide/heure à  $\sim 0,3$  molécules d'eau/lipide/heure pour les vitesses de diffusion. Pour les faibles hygrométries, les vitesses initiales sont élevées car il se produit un phénomène de convection où les échanges entre les molécules d'eau de l'air à l'interface sont rapides. Une saturation de la monocouche d'eau se produit puis de nouveaux sites d'attraction se créent au fur et à mesure de l'hydratation. Lorsqu'on approche de l'équilibre, les molécules d'eau doivent diffuser dans toute la structure afin de trouver des sites disponibles, d'où des vitesses très faibles.

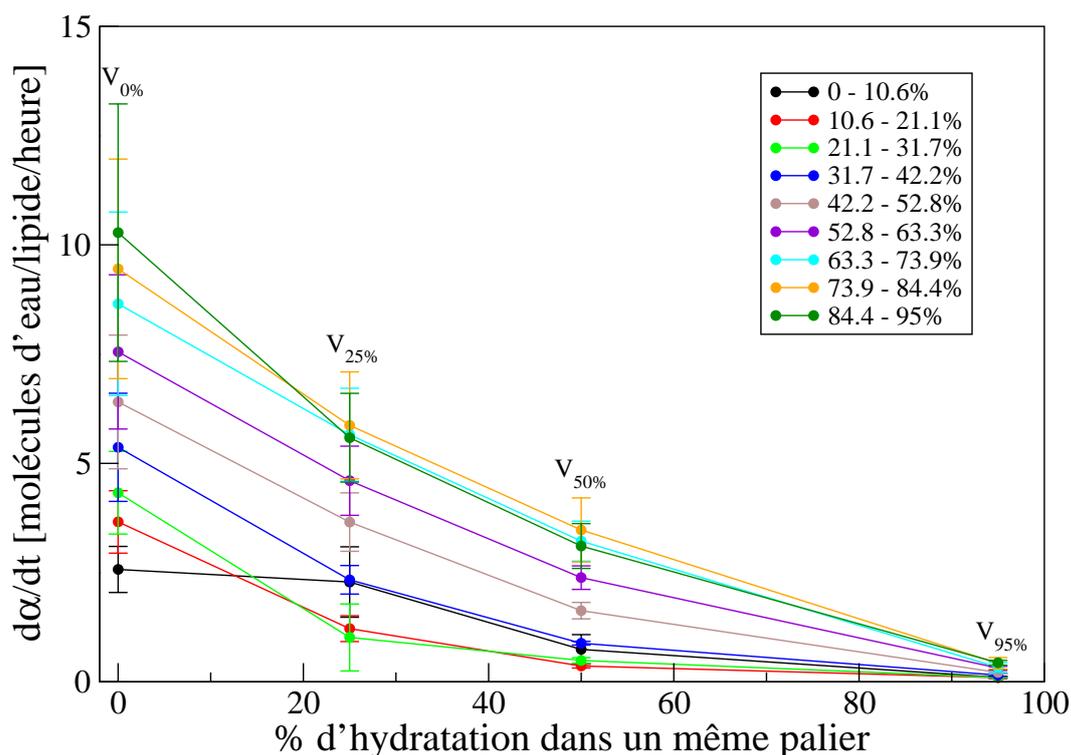


Figure III.15. Vitesses initiales d'hydratation en fonction de la progression d'hydratation dans un même palier (à 0, 25, 50 et 95% d'hydratation) pour la PC de saumon. Les résultats sont présentés comme une moyenne de trois essais avec les écart-types. Chaque couleur correspond à une étape d'hydratation.

Enfin, la dernière remarque concerne la vitesse à 95% qui, indépendamment de l'hygrométrie environnante, tend vers une valeur unique, dite vitesse de diffusion. On parle effectivement de vitesse de diffusion lorsqu'on s'approche de l'équilibre puisque tous les sites d'eau qui étaient accessibles au niveau des bicouches sont saturés et que, de ce fait, la vitesse représente le passage d'eau à travers les multicouches. De manière générale, il existe deux types de diffusion : la première est appelée mouvement Brownien ou auto-diffusion puisqu'aléatoire et non coordonnée ; la deuxième est conduite par un courant et est appelée flux [201]. Pour les produits alimentaires, le coefficient de diffusion,  $D$  (en  $m^2/s$ ), peut être obtenu des données cinétiques à partir de trois procédés : le séchage, la sorption et la perméation [201]. Dans le cas des phospholipides,  $D$  peut être déterminé à partir de la 2<sup>ème</sup> loi de Fick en utilisant le gradient de concentration en eau comme seule force agissant sur le transfert de masse.

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

Équation 29

où C la concentration en eau, x l'épaisseur du film et  $\partial t$  la variation de temps pendant laquelle le flux de matière est mesuré.

La méthode DVS a déjà été utilisée à plusieurs reprises pour déterminer D dans l'amidon de maïs [201], ou pour la pomme de terre [202] mais à notre connaissance, il n'existe pas de données dans le cas des films de phospholipides. Ici, la mesure de  $d\alpha/dt$  correspond au  $\partial C/\partial t$ . La détermination de D repose donc sur la résolution de l'équation 29 qui a été réalisée par Crank [203]. Cependant, la 2<sup>ème</sup> loi de Fick s'applique lorsque l'épaisseur du film est constante et homogène. Or, dans notre cas, la longueur du film x de phospholipides ne peut être déterminée puisque la géométrie de l'appareil de mesure ne permet pas d'assurer une répartition parfaitement homogène des phospholipides sur l'ensemble de la cuve, entraînant une variation de l'épaisseur du film. C'est pourquoi concernant les phospholipides, le coefficient de diffusion des molécules d'eau à travers des multicouches est généralement déterminé par simulation en dynamique moléculaire et estimé entre 1,9 et  $3,4 \times 10^{-3}$  cm/s [204]. Une perspective de cette étude serait de faire évoluer l'équipement actuel et de remplacer la cuve par une coupelle à fond plat permettant le dépôt du film de phospholipide de façon homogène. Il deviendrait alors possible de déterminer D en utilisant les solutions des équations déterminées par Crank et comparer ces valeurs aux valeurs obtenues par simulation.

Dans cette étude, on s'est donc intéressé principalement aux propriétés des phospholipides d'absorber des molécules d'eau et nous avons vérifié si la composition moléculaire des PC influait sur cette capacité. Une moyenne sur les neuf paliers a donné respectivement une vitesse de 0,24, 0,29 et 0,49 molécules d'eau/lipide/heure pour les PC de saumon, œuf et soja respectivement. Du fait de l'unité de temps choisi (heure), on peut considérer que les trois PC ont des valeurs similaires et que la composition spécifique de la PC de saumon n'influe pas sur la vitesse d'adsorption des molécules d'eau.

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau III.11. Vitesses initiales d'hydratation à différent taux dans un même palier pour les PC de saumon, d'œuf et de soja.

palier - HR (%)	stade d'hydratation (%)	d $\alpha$ /dt (molécules d'eau/lipide/heure)		
		saumon	œuf	soja
1 0-10,6	0	2,57 ± 0,5	2,75 ± 0,3	2,65 ± 0,5
	25	2,29 ± 0,8	2,75 ± 0,84	2,65 ± 0,5
	50	0,74 ± 0,3	2,27 ± 0,1	1,53 ± 0,4
	95	0,10 ± 0,0	0,67 ± 0,4	0,15 ± 0,0
2 10,6-21,1	0	3,66 ± 0,7	3,46 ± 0,4	2,81 ± 0,1
	25	1,22 ± 0,3	1,44 ± 0,4	1,29 ± 0,4
	50	0,36 ± 0,0	0,7 ± 0,3	2,58 ± 1,0
	95	0,10 ± 0,0	0,13 ± 0,0	0,35 ± 0,1
3 21,1-31,7	0	4,33 ± 0,9	4,17 ± 0,6	4,09 ± 0,4
	25	1,01 ± 0,8	2,29 ± 1,2	1,10 ± 0,3
	50	0,49 ± 0,1	1,02 ± 0,7	0,5 ± 0,3
	95	0,10 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,11 ± 0,1
4 31,7-42,2	0	5,37 ± 1,2	4,70 ± 0,7	5,59 ± 1,1
	25	2,33 ± 0,3	3,20 ± 1,5	2,41 ± 0,8
	50	0,88 ± 0,0	1,41 ± 1,0	1,88 ± 0,9
	95	0,15 ± 0,0	0,16 ± 0,1	0,39 ± 0,1
5 42,2-52,8	0	6,41 ± 1,5	5,29 ± 0,9	6,41 ± 1,5
	25	3,66 ± 0,7	3,80 ± 0,7	3,38 ± 0,2
	50	1,63 ± 0,2	1,79 ± 1,2	2,08 ± 0,8
	95	0,21 ± 0,0	0,20 ± 0,1	0,61 ± 0,0
6 52,8-63,3	0	7,55 ± 1,8	5,95 ± 1,1	6,70 ± 1,2
	25	4,60 ± 0,8	4,31 ± 2,1	4,51 ± 0,9
	50	2,38 ± 0,3	2,10 ± 1,4	2,73 ± 0,6
	95	0,31 ± 0,0	0,26 ± 0,1	0,72 ± 0,1
7 63,3-73,9	0	8,65 ± 2,1	6,80 ± 1,3	7,83 ± 1,6
	25	5,65 ± 1,1	4,65 ± 2,0	5,69 ± 0,6
	50	3,22 ± 0,5	2,36 ± 1,4	2,81 ± 0,2
	95	0,33 ± 0,1	0,24 ± 0,1	0,74 ± 0,0
8 73,9-84,4	0	9,45 ± 2,5	7,25 ± 1,3	8,07 ± 3,4
	25	5,87 ± 1,2	4,84 ± 2,0	5,34 ± 1,3
	50	3,48 ± 0,7	2,66 ± 1,5	3,76 ± 0,8
	95	0,42 ± 0,1	0,33 ± 0,2	0,69 ± 0,2
9 84,4-95	0	10,28 ± 2,9	5,02 ± 4,45	7,23 ± 4,4
	25	5,59 ± 1,0	5,06 ± 1,9	5,48 ± 2,0
	50	3,11 ± 0,5	2,87 ± 1,2	2,83 ± 1,2
	95	0,44 ± 0,0	0,44 ± 0,2	0,66 ± 0,1

### IV. Etude des monocouches à l'interface air/eau

Les isothermes de compression pour les PC de saumon, d'œuf et de soja ont été réalisées à 22°C. Les isothermes présentées en Figure III.16 correspondent à un résultat moyen de 3 essais minimum pour chaque PC. Les monocouches de PC présentent un comportement similaire sous l'effet de la compression, à savoir une augmentation progressive de la pression de surface partant d'une valeur nulle, jusqu'à l'état de collapse la pression atteint une valeur plateau d'environ 45 mN/m (similaire pour les trois PC). Cependant, il apparaît que les AGPI-LC de la PC de saumon confèrent une plus grande compressibilité de la monocouche puisque l'aire moléculaire minimum atteinte est de 51 Å<sup>2</sup>/lipide alors qu'elle est de 61 et 71 Å<sup>2</sup>/lipide pour la PC d'œuf et de soja respectivement.

Il a été démontré que les propriétés d'empaquetage des monocouches devenaient comparables à celles des bicouches de lipides lorsque les monocouches atteignent une pression de surface de 35 mN/m [205]. A cette pression de surface, l'aire par lipide pour les différentes PC est de 62, 74 et 83 Å<sup>2</sup>/lipide pour les PC de saumon, d'œuf et de soja respectivement. L'aire moyenne déterminée par diffraction des rayons X était proche pour les PC de saumon (64,8 Å<sup>2</sup>/lipide) et d'œuf (71,7 Å<sup>2</sup>/lipide) en excès d'eau. Pour la PC de soja en revanche, il semble que l'isotherme de compression soit décalé vers des aires moléculaires plus importantes puisque la valeur à 35mN/m est surestimée à 83 Å<sup>2</sup>/lipide alors qu'en bicouches, les rayons X donnent une aire allant de 63 à 72 Å<sup>2</sup>/lipide [11], [206].

On en revient au problème que pose la détermination de l'aire moléculaire des phospholipides et ainsi de la difficulté à pouvoir comparer les résultats en monocouches et en bicouches. Par ailleurs, il est également délicat de comparer les résultats obtenus dans la présente étude avec des valeurs de la littérature puisque les résultats en monocouche sont fortement dépendants des conditions expérimentales telles que la température, la composition de la phase aqueuse et la vitesse de compression. Pour des monocouches de SDPC par exemple, les valeurs de la pression et de l'aire au collapse ainsi que l'aire à 35mN/m vont de 37 à 45,4 mN/m, de 50,2 à 57,5 et de 56 à 70,6 Å<sup>2</sup>/lipide respectivement [109], [110], [148].

Une très bonne étude de Duncan et *al.* [16] sur l'effet des conditions expérimentales qui agissent sur la comparaison des isothermes de DPPC a permis de relever les points suivants : la dynamique de compression a un faible effet tandis que le type d'appareil va influencer sur la forme de l'isotherme. La nature du solvant est également importante puisqu'un faible pH va entraîner des pressions de surfaces maximales plus grandes. Même le type de solvant dans

lequel est dissout le composé peut influencer sur la position de l'isotherme le long de l'axe surface/molécule.

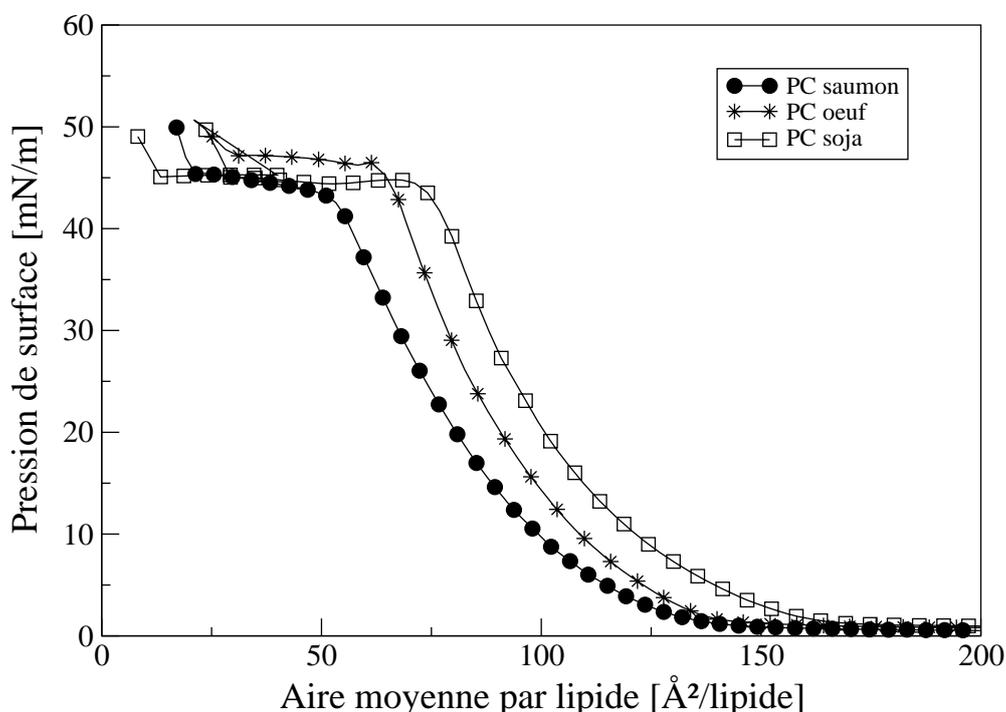


Figure III.16. Isothermes de pression de surface en fonction de l'aire par lipide pour les PC de saumon, d'œuf et de soja à l'interface air/eau.

Par ailleurs, on remarque que malgré la présence des AGPI-LC de la PC de saumon, celle-ci ne suit pas la tendance générale des monocouches enrichies en AGPI qui trouvent leurs isothermes de compression décalés vers des aires moléculaires plus importantes au fur et à mesure que les insaturations augmentent en position *sn-2* [109], [110]. De même que pour l'évolution de l'aire moléculaire en fonction de l'hydratation déterminée par la distance de répétition, on retrouve ici pour la PC de saumon un comportement particulier puisque les monocouches présentent des aires moléculaires plus faibles comparées à celles de la PC d'œuf, indépendamment de la pression de surface appliquée. Cependant, il n'est néanmoins pas surprenant de retrouver la PC de soja avec les aires moléculaires les plus élevées étant donné que sa composition moléculaire révèle une forte proportion en espèces contenant deux AGPI en *sn-1* et *sn-2* (21% de DLPC). Or un isotherme de compression d'une monocouche de DLPC présente des aires moléculaires supérieures à un isotherme de compression d'une monocouche de PDPC (1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine) [207].

### V. Discussion

Dans cette partie, les résultats sur la description de certaines propriétés physico-chimiques de la phosphatidylcholine extraite et purifiée à partir de têtes de saumon ont été présentés. La caractérisation détaillée de la composition de la PC de saumon a montré sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) puisqu'ils représentent jusqu'à 47% des acides gras totaux du mélange. De plus, presque 50% des acides gras totaux sont de la famille des oméga 3 ce qui fait des têtes de saumon une source naturelle non négligeable pour les phospholipides enrichis en AGPI-LC. La composition moléculaire du mélange indique que les espèces majoritaires sont représentées par une combinaison d'un AGS avec un AGPI ou d'un AGS avec un AGMI ce qui laissent supposer que la majorité des AGPI se retrouvent en position *sn*-2, comme il est de coutume dans les phospholipides naturels.

Les propriétés de la PC de saumon ont été comparées à celle d'autres PC d'origine naturelle également (PC de soja et PC d'œuf) mais dépourvus en AGPI-LC dans le but de montrer l'influence de ces acides gras sur le comportement des phospholipides. Tout d'abord, l'étude structurale de la PC de saumon à plusieurs taux d'hydratation et plusieurs températures a révélé que celle-ci adopte majoritairement la forme de multicouches en phase  $L_{\alpha}$ . De plus, elle ne présente pas de déphasage au sein des multicouches. L'étude simultanée par diffraction des rayons X, par DSC par microscopie optique à lumière polarisante a permis d'élaborer le diagramme de phase PC de saumon – eau entre  $-25^{\circ}\text{C}$  et  $60^{\circ}\text{C}$ . Un fait non usuel que l'on peut noter dans le comportement de phase de ce phospholipide est l'augmentation de la température de transition de phase  $T_m$  lorsqu'on augmente la teneur en eau. Cette caractéristique est également observée pour la PC de soja mais pas pour la PC d'œuf. L'étude thermodynamique de la transition de ces PC à différents taux d'hydratation permet de mettre en évidence la fusion séparée des chaînes carbonées des phospholipides et des cristaux d'eau.

Les capacités d'hydratation de la PC de saumon sont fortement influencées par la présence des AGPI-LC, ces derniers provoquant une plus grande absorbance de l'eau par les bicouches. Ce phénomène est observé à la fois pour la sorption de vapeur d'eau mais aussi quand elle est à l'état liquide. Pour les multicouches, ce phénomène se caractérise essentiellement au niveau du film d'eau séparant deux multicouches successives. Par ailleurs, la modélisation mathématique des résultats des isothermes de sorption en utilisant le modèle TSS a permis

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

d'extrapoler les valeurs d'absorption de vapeur d'eau lorsque l'humidité relative (HR) se rapproche de 100%. On remarque que les différences entre la PC de saumon et les deux autres PC se font sentir seulement lorsque HR est la plus élevée. Enfin, l'utilisation du modèle BET a été préférée par rapport au modèle TSS pour la détermination des valeurs de monocouche d'eau au niveau des têtes polaires parce que ce modèle est plus adapté pour les HR inférieures à 40%. Celles-ci montrent que ce paramètre est également influençable par la nature des acides gras présents sur les PC avec une valeur significativement plus élevée pour la PC de saumon comparé aux PC d'œuf et de soja. La mesure précise de l'hydratation des phospholipides en fonction du temps par le DVS a permis d'obtenir les vitesses initiales à divers stades de chaque palier. Plusieurs remarques se dégagent de cette analyse. La première est que ces vitesses décroissent lorsque l'échantillon se rapproche de l'équilibre et ce phénomène s'applique à chaque palier. De plus, plus on augmente l'HR, plus les vitesses initiales à 0% augmente. Cependant, quelle que soit la zone d'HR dans laquelle se trouve l'échantillon, les vitesses initiales convergent toutes vers une valeur unique lorsqu'on atteint 95% d'hydratation au sein d'un même palier. Si on pourrait d'abord penser que cette vitesse s'apparente à une vitesse de diffusion du fait des propriétés des multicouches à ce stade d'hydratation, cette valeur ne peut être comparé au coefficient de diffusion  $D$  du fait de la répartition inégale de pression au sein des multicouches.

Les propriétés structurales, déterminées par diffraction des rayons X en utilisant la méthode de Luzatti, ont permis de démontrer une caractéristique spécifique de l'hydratation de la PC de saumon. En effet, si on a déjà vu que la présence des AGPI-LC permettait d'augmenter les capacités d'hydratation de la PC de saumon, il semble que les molécules d'eau ajoutées ne se positionnent pas au niveau de la tête polaire mais permettent le gonflement du film d'eau. Ce phénomène entraîne une surface moléculaire quasi constante malgré l'augmentation de l'hydratation. Il n'est pas le résultat de la présence des AGPI-LC puisqu'un système de PDPC pur ne présente pas cette caractéristique, ni le résultat de l'hétérogénéité de la composition de la PC saumon puisque la PC d'œuf et la PC de soja présentent elles une augmentation de l'aire par lipide avec l'hydratation.

Une autre caractéristique spéciale de la PC de saumon mise en exergue concerne ses propriétés d'empaquetage des chaînes acyles et qui ont été étudiées par compression de film à l'interface air – eau. Alors que les résultats trouvés dans la littérature présentent les PC enrichis en AGPI comme ayant la plus large surface moléculaire, du fait de la présence des

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

insaturations en position *sn*-2 dans la conformation des chaînes, la PC de saumon adopte un comportement différent. En effet, comparée aux PC d'œuf et de soja, la PC de saumon présente l'aire par lipide la plus faible quel que soit le taux de compression du film.

### **Partie 3 : Simulation in silico de bicouches de phosphatidylcholine de saumon**

Les résultats expérimentaux sur la PC de saumon ont démontré des propriétés spécifiques pour cette dernière comparé à d'autres PC d'origine naturelle également mais dépourvues d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Cependant, les techniques utilisées ne permettent qu'une observation des effets globaux et de l'évolution du comportement de la PC de saumon sous différentes conditions et ne permettent pas d'expliquer les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ces processus. C'est pourquoi une étude complémentaire de ces systèmes par dynamique moléculaire a été réalisée afin d'obtenir des informations à un niveau atomique des aspects structuraux et dynamiques.

La PC de saumon extraite est un ensemble de différentes structures composées de 20 espèces moléculaires différentes comportant des acides gras aux longueurs de chaînes et nombre d'insaturations variables. Cette dernière étant composée de 20 espèces moléculaires différentes, présentes à des taux très variables. Il est très difficile de toutes les représenter en simulation. Comme nous l'avons mentionné dans la partie Matériels et Méthodes, seules les 5 espèces les plus représentatives ont été conservées pour l'élaboration du système modèle. Il était d'abord nécessaire de vérifier la validité du modèle choisi pour représenter le mélange d'origine et, pour ce faire, nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus expérimentalement. Nous avons ensuite étudié plus amplement les caractéristiques des bicouches lipidiques du mélange.

#### **I. Comparaison aux résultats expérimentaux**

##### **1. Evolution de la distance de répétition des bicouches**

La Figure III.17 présente l'évolution de la distance de répétition pour le modèle de bicouches lipidiques de PC saumon à 298K. Ces résultats concordent bien avec les distances de répétition obtenues par diffraction des rayons X. Ils montrent notamment que la distance de répétition des bicouches est fortement liée à leurs taux d'hydratation et qu'elle augmente constamment pour des taux compris entre 5 et 35 molécules d'eau par lipide. Rappelons que pour le système à 5 molécules d'eau par lipide, le spectre expérimental de distance de Bragg

ne présente pas de structure lamellaire mais est plus représentatif d'une structure en micelle inverse avec la distance de répétition correspondant à la distance entre deux cœurs de micelle. Cependant, il semble que cette distance corresponde également à la distance de répétition pour le système simulé en multicouches avec le même taux d'hydratation. Le fait que les résultats de simulation soient en très bon accord avec les résultats expérimentaux démontre que les paramètres du champ de force choisis ainsi que le modèle simplifié permettent de reproduire de façon correcte les résultats expérimentaux à n'importe quel taux d'hydratation.

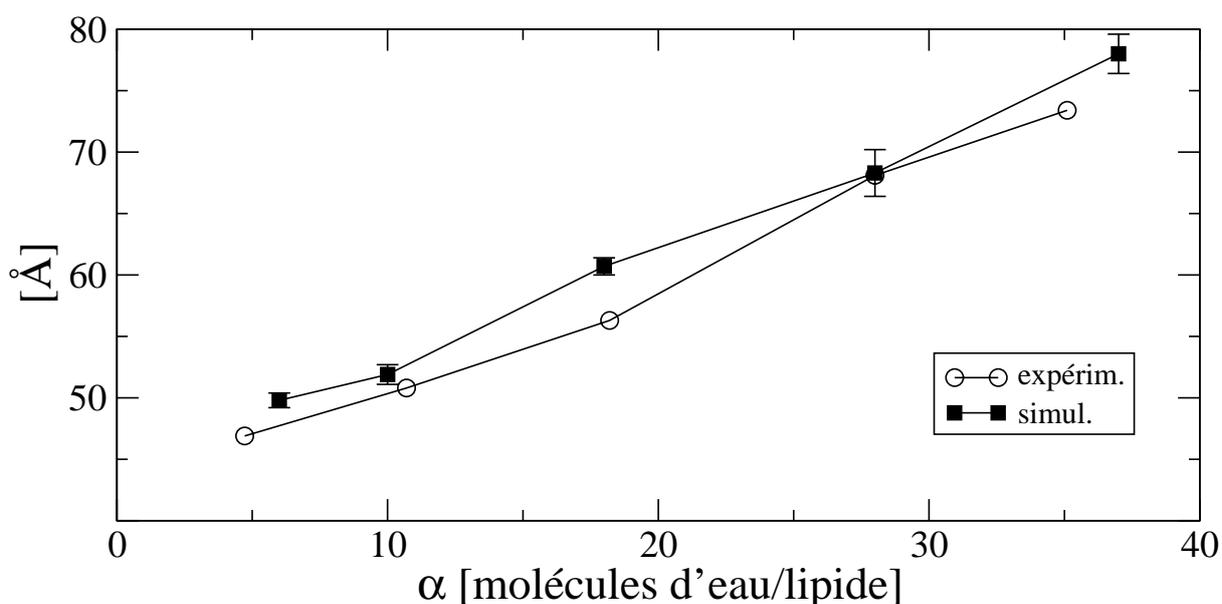


Figure III.17. Comparaison des résultats expérimentaux et de simulation pour la distance de répétition de la PC saumon en fonction du taux d'hydratation. Les résultats de simulation sont présentés avec les écarts-types pour une analyse réalisée sur les dernières 6 ns.

## 2. Evolution de l'aire par lipide

La Figure III.18 présente l'évolution de l'aire moyenne occupée par un lipide en fonction du taux d'hydratation pour les bicouches de PC saumon obtenue par simulation et par diffraction des rayons X. Nous avons vérifié que l'aire par lipide des systèmes se stabilise à la fin de chaque simulation (durée moyenne des trajectoires  $\sim 20$  ns) et nous avons reporté les valeurs correspondant aux 6 dernières ns de chaque trajectoire. Les valeurs s'étendent de  $56,6 \pm 0,4 \text{ \AA}^2$  pour le système le moins hydraté à  $59,5 \pm 0,8 \text{ \AA}^2$  pour le système saturé en eau. On remarque que les résultats obtenus par simulation sont toujours inférieurs aux résultats expérimentaux. Cependant, la même tendance est observée, à savoir une aire par tête polaire constante malgré l'augmentation de la teneur en eau. Ce phénomène semble être spécifique à la PC de saumon

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

puisque'il a été montré expérimentalement avec une molécule de SDPC contenant du DHA en *sn*-2 [121], de la PC d'œuf [10], ainsi qu'en simulation avec une molécule de DPPC [208], que l'augmentation de l'hydratation induit toujours un accroissement de l'aire par lipide. Cette particularité ne semble pas être liée à la présence de doubles liaisons multiples dans les chaînes carbonées puis que le système SDPC ne présente pas la même tendance. Ce n'est pas non plus le résultat de la pluri-composante du système due à son origine naturelle, la PC d'œuf ayant démontré un comportement opposé.

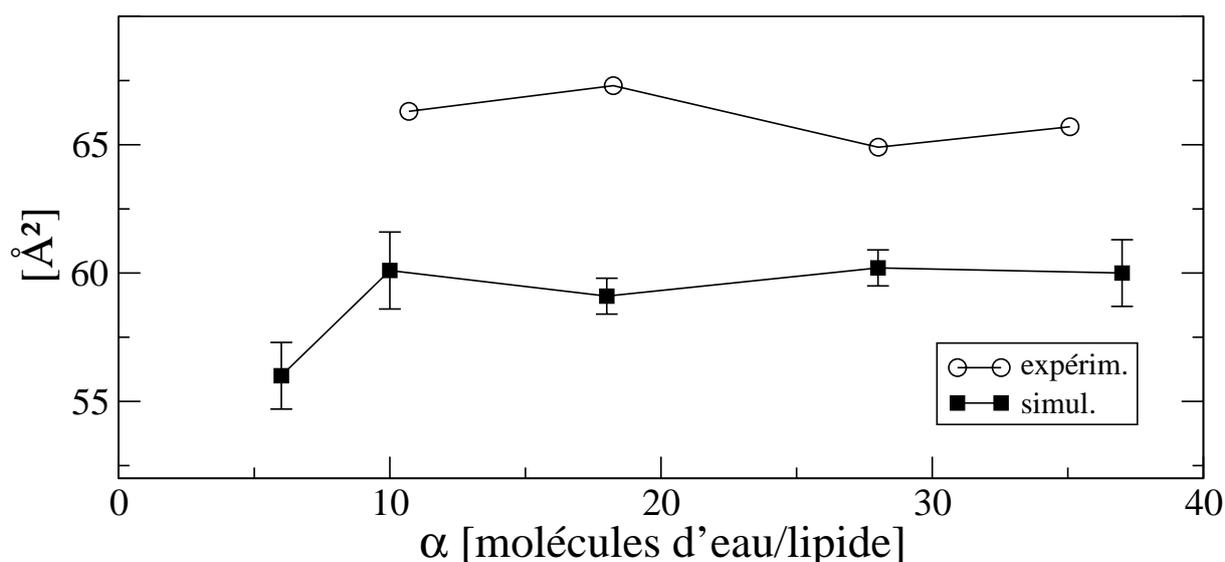


Figure III.18. Comparaison des résultats expérimentaux et de simulation pour l'aire par lipide de la PC saumon en fonction du taux d'hydratation. Les résultats de simulation sont présentés avec les écarts-types pour une analyse réalisée sur les dernières 6 ns. Pour le système expérimental à 4,6 molécules d'eau par lipide, la détermination de l'aire par lipide n'a pas été effectuée puisque les spectres de rayons X ont montré que le système n'était pas en multicouche.

Le système simulé de PC saumon au plus large taux d'hydratation (37 molécules d'eau par lipide) a été comparé aux systèmes purs de POPC et PDPC à une même température. L'essentiel des données structurales relatives à l'étude de ces trois systèmes est reporté dans le Tableau 13. L'influence du degré d'insaturation des chaînes carbonées sur le comportement de bicouches de phospholipides a déjà été étudiée dans la littérature que ce soit par une approche expérimentale [4] ou par simulation en dynamique moléculaire [209]. L'un des effets observés se rapporte à l'aire par lipide où celle-ci tend à augmenter avec le nombre d'insaturations. Dans notre étude, si une légère différence est observée entre POPC et PDPC avec des surfaces moléculaires de  $58,5 \pm 0,6 \text{ \AA}^2$  et  $60,6 \pm 0,8 \text{ \AA}^2$  respectivement, le système de PC saumon s'inscrit entre ces deux valeurs. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

la littérature dans les mêmes conditions de température, de degré d'hydratation et avec des simulations ayant utilisé un champ de force identique [210]. Notons ici que lors de cette dernière étude par simulations, les auteurs ont trouvé des valeurs nettement supérieures avec des champs de force différents :  $68 \text{ \AA}^2$  pour POPC et  $71 \text{ \AA}^2$  pour PDPC avec le champ de force GROMOS, et  $71,2 \pm 1,1 \text{ \AA}^2$  pour POPC et  $69,1 \pm 0,9 \text{ \AA}^2$  pour PDPC avec un champ de force modifié par l'auteur. Une autre étude a reporté dernièrement une sous-estimation similaire de 10% de l'aire par lipide obtenue par simulation sur des systèmes hautement insaturés et conduites avec le champ de force CHARMM [116].

Expérimentalement, les valeurs sont également supérieures avec  $68,3 \pm 1,5 \text{ \AA}^2$  pour POPC [211] et  $69,2 \text{ \AA}^2$  pour PDPC [101]. Ainsi, que ce soit pour le système PC saumon ou pour les systèmes purs de POPC et PDPC, l'écart de l'aire par lipide par rapport aux résultats expérimentaux peut être attribué à l'incertitude des paramètres du champ de force. Notons cependant qu'étant donné que les simulations des trois systèmes ont été réalisées dans les mêmes conditions, on peut poursuivre l'étude comparative des systèmes et caractériser l'effet des insaturations sur les autres propriétés structurales.

Tableau III.12. Récapitulatif des résultats de simulation des bicouches lipidiques pour les différents systèmes à 298K.

	PC saumon	POPC	PDPC
$\alpha$ (H <sub>2</sub> O/lip)	37	32	36
$d$ (Å)	$78,6 \pm 1,1$	$74,4 \pm 0,8$	$78,0 \pm 1,1$
Aire par lipide, A (Å <sup>2</sup> )	$59,5 \pm 0,8$	$58,5 \pm 0,6$	$60,6 \pm 0,8$
Epaisseur bicouche, $d_{H/H}$ (Å)	41,1	41,1	37,1
Epaisseur hydrophobe, $d_{HC}$ (Å)	27,1	26,7	27,3
$g_{NOw}(r)$ (molécules d'eau/tête polaire)	15,5	15,2	15,3
$g_{POw}(r)$ (molécules d'eau/tête polaire)	5,8	5,8	5,8
$g_{OOw}(r)$ (molécules d'eau/tête polaire)	2,3	2,3	2,3

### 3. Détermination des profils de densité

#### *Description globale des différents profils*

La distribution spatiale des différents composants des lipides le long de l'axe  $z$  perpendiculaire à la membrane est présentée en Figure III.19 pour la PC de saumon, le POPC et le PDPC. La longueur totale de la bicouche et des couches d'eau qui l'entourent est divisée en plusieurs tranches de taille identique. Les résultats correspondent au nombre d'atomes par unité de volume pour chaque groupe, en considérant tous les atomes du groupe excepté les atomes d'hydrogène. Ces densités sont ensuite moyennées dans le temps (analyse sur les 4 dernières ns). Tout d'abord, la symétrie des profils entre les couches supérieures ( $z > 0$ ) et inférieures ( $z < 0$ ) démontre que les systèmes sont bien équilibrés. Comme on peut l'observer, la distribution des différents segments de la tête polaire (choline, glycérol et phosphate) est virtuellement identique pour les trois systèmes. La principale différence entre les bicouches POPC et PDPC se retrouve au niveau du profil de densité des doubles liaisons (groupe alcènes). Pour le POPC, un pic est observé à 9 Å du centre de la bicouche, correspondant à l'unique double liaison présente entre le C<sub>9</sub> et C<sub>10</sub> de la chaîne oléique. Pour PDPC, le profil alcène est bien plus étendu puisque le lipide présente six doubles liaisons allant du C<sub>4</sub> au C<sub>20</sub> de la chaîne docosahexaénoïque. La distribution du groupe alcène pour la PC de saumon est similaire à celle de PDPC ce qui sous-entend que les chaînes insaturées adoptent une conformation similaire dans le mélange que dans un système membranaire insaturé pur. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Hyvönen et *al.* où la distribution des doubles liaisons le long des bicouches devenait naturellement plus large lorsque le nombre d'insaturations augmentait par chaîne [209].

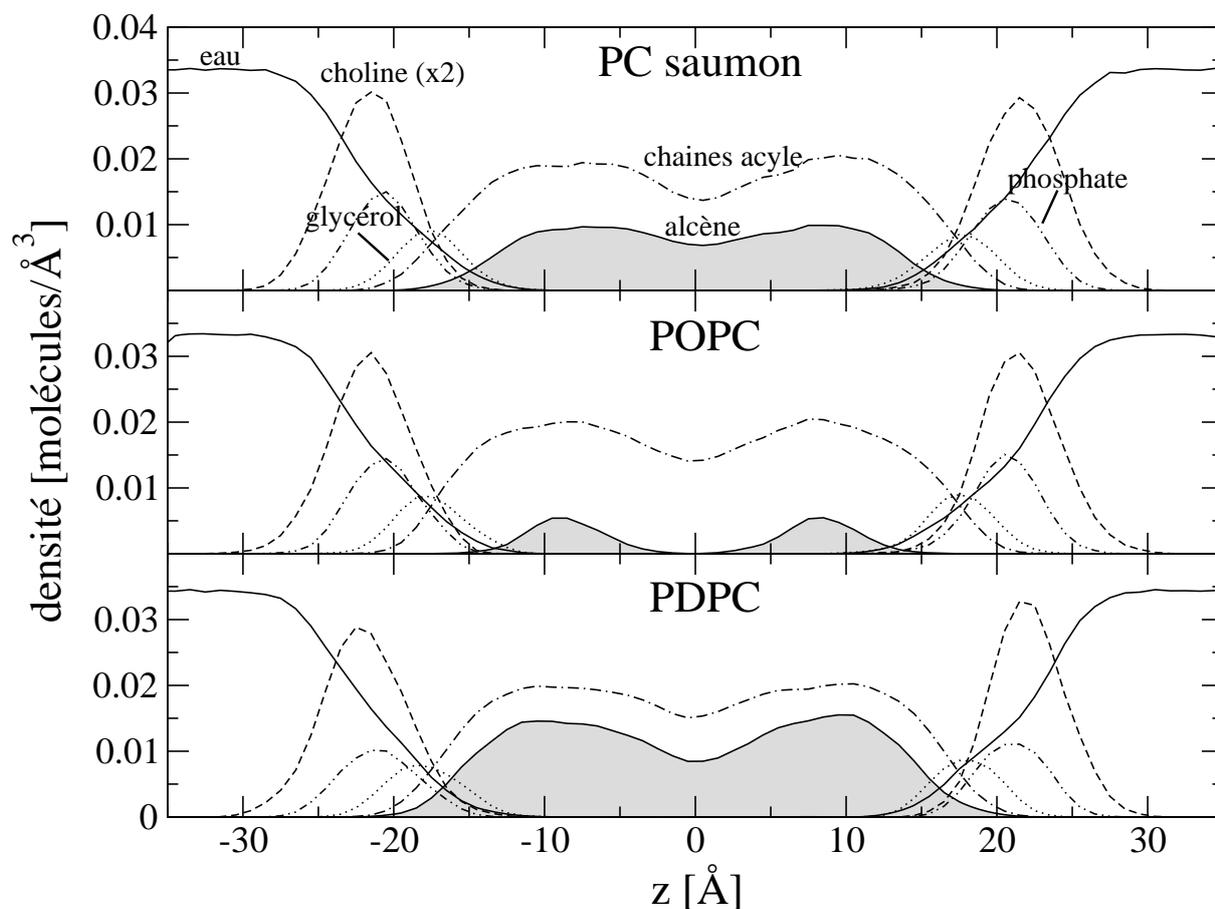


Figure III.19. Profil de densité pour les systèmes de PC saumon, POPC et PDPC en fonction de la localisation au niveau de la normale de la bicouche, le 0 de l'axe  $z$  étant centré par rapport au centre de la membrane. Profils présentés pour les différents groupes constitutifs de la bicouche : l'eau (trait plein), le groupement choline qui, par souci de clarté, a été multiplié par 2 (tirets), le groupement phosphate (tiret – point – point), le groupement glycérol (pointillés), les chaînes acyles (tiret – point) et les doubles liaisons dans les chaînes acyles (en gris). Chaque profil est montré à 298K et à pour un état saturé en eau.

Concernant les autres profils de densité partiels, on remarque que l'eau pénètre profondément dans la bicouche et atteint les doubles liaisons, même pour le système POPC. Ollila et *al.* [112] ont trouvé des résultats similaires et ont observé que la probabilité de contact entre l'eau et les doubles liaisons augmentait avec le nombre d'insaturation des chaînes carbonées, phénomène qu'ils ont corrélé avec l'augmentation de la probabilité de peroxydation des chaînes consécutive à une introduction d'oxydants solubles dans l'eau.

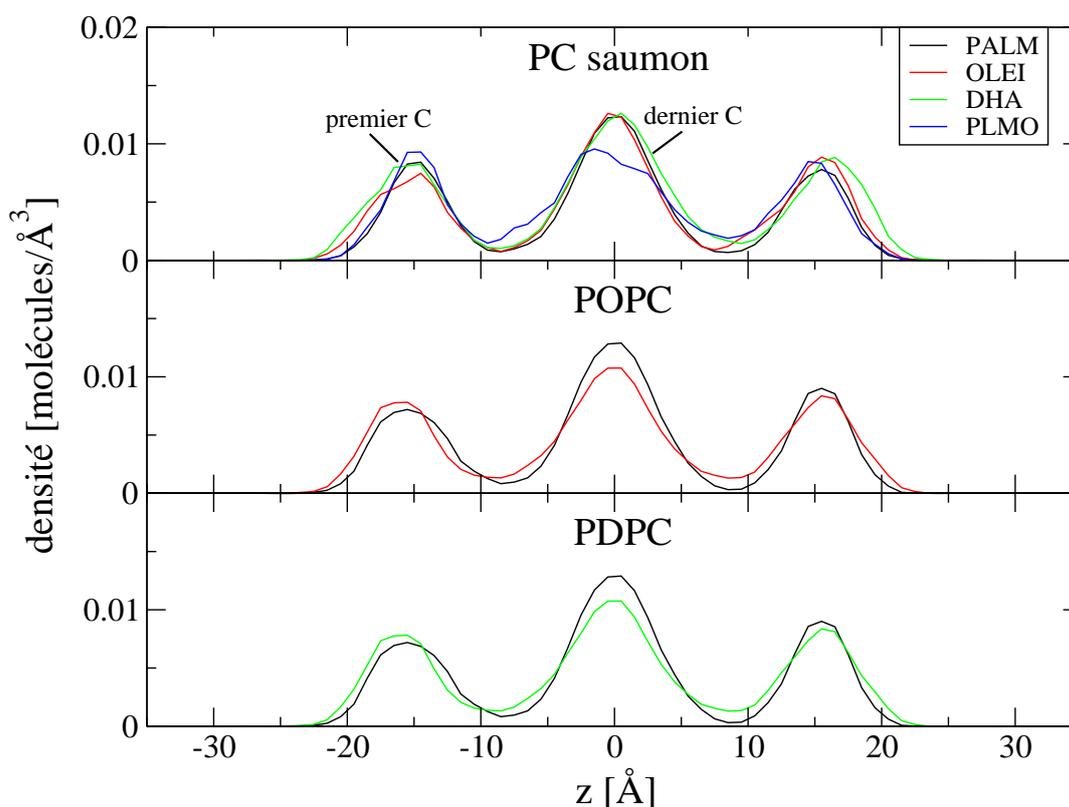


Figure III.20. Profils de densité correspondant aux premiers et derniers atomes de carbone des chaînes acyles des systèmes PC saumon, POPC et PDPC à 298K.

#### *Données structurales dérivées des profils de densité*

Plusieurs facteurs de structure peuvent être obtenus à partir des profils de densité tels que l'épaisseur de la bicouche,  $d_{H/H}$ , qui correspond à la distance entre les têtes polaires, et la distance hydrophobe,  $d_{HC}$ , qui correspond à la distance à 90% du profil de densité maximum des chaînes acyles (cette valeur est choisie de manière arbitraire afin d'éviter de prendre en compte la pénétration de l'eau dans la membrane). Ces différentes données sont reportées dans le Tableau III.12. Une différence significative est observée pour  $d_{H/H}$  entre les trois systèmes : la PC de saumon et le POPC ont une valeur identique de 41,1 Å tandis que le PDPC présente une épaisseur bien plus faible de 37,1 Å. Comme la distance hydrophobe est similaire pour les trois systèmes, ceci implique que pour le système PDPC, les têtes polaires doivent être plus compactées (inclinées) que dans les deux autres systèmes.

Tout comme pour la distance de répétition et l'aire par lipide, il est possible de comparer les résultats obtenus par simulation avec les données expérimentales tirées des méthodes de diffraction de neutrons et de rayons X. Pour la PC de saumon, la mesure du profil de densité

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

électronique n'a pas été réalisée. Cependant, avec les résultats de diffraction de rayons X, il a été possible d'estimer l'épaisseur de la bicouche et la distance hydrophobe. Pour les systèmes POPC et PDPC, ces mêmes valeurs ont été trouvées dans la littérature.

Concernant POPC, il apparaît que l'épaisseur de la bicouche trouvée dans la présente étude soit surestimée comparée à la valeur expérimentale obtenue par Kucerka et *al.* [211] puisqu'ils obtiennent une valeur de 37 Å (comparé à 41,1 Å). Pour la distance hydrophobe, le résultat de 26,7 Å obtenu ici est en accord avec la valeur expérimentale obtenue par Kucerka et *al.* (27,1 Å). On en déduit que pour ce système, les interactions entre les molécules d'eau et les têtes polaires conduisent à une extension de ces dernières mais ce qui n'est pas retrouvé en conditions expérimentales.

Concernant le PDPC, les résultats de simulation sont très en accord avec les résultats expérimentaux puisqu'on retrouve une épaisseur de bicouche de 37,1 Å alors que les données expérimentales donnent des valeurs de 36 [115] et 38,1 Å [111]. La distance hydrophobe est de 27,3 Å, légèrement inférieure à la valeur trouvée par Petrache et *al.* qui est de 28 Å.

On retrouve une distance  $d_{H/H}$  significativement plus importante pour POPC comparé à PDPC tout comme dans l'étude menée par Rajamoorthi et *al.* avec une comparaison entre PDPC et la PC d'œuf (la PC d'œuf étant principalement composée de POPC) sur la détermination du profil de densité électronique sur ces deux systèmes [115].

La PC de saumon adopte un comportement particulier du fait que l'aire par lipide moyenne dans la bicouche reste constante malgré l'augmentation de l'hydratation. A 35 molécules d'eau par lipide, l'épaisseur de la membrane estimée expérimentalement est de 40 Å et  $d_{H/C}$  est de 33 Å. Les valeurs expérimentales et de simulation correspondent parfaitement dans ce cas pour  $d_{H/H}$  alors que  $d_{H/C}$  expérimentale est légèrement supérieure.

#### *Vérification des données estimées expérimentalement*

Dans la partie expérimentale, la détermination de l'aire par lipide à partir des distances de répétition nécessitait au préalable de connaître, ou d'estimer, le volume moléculaire moyen,  $V_{PC}$ , et la densité,  $\rho$ , de la PC de saumon. Ces valeurs n'ayant pas été déterminées expérimentalement, il avait été décidé de prendre la valeur de la PC d'œuf pour la densité, c'est-à-dire 1,02 g.cm<sup>-3</sup> [10], ce qui a conduit à un volume moléculaire de 1275 Å<sup>3</sup>/lipide. Il est possible cependant d'évaluer et donc de vérifier ces valeurs à partir des résultats de simulation :

$$V_{PC} = \frac{x \times y \times \frac{d_H}{H}}{n}$$

Équation 30

où  $x$  et  $y$  sont les dimensions de la boîte de simulation et  $n$  le nombre de lipides dans un système. La densité est ensuite obtenue selon l'équation 18.

En prenant la valeur de  $770 \text{ g.mol}^{-1}$  pour  $M$  (déterminée à partir de la composition moléculaire du système donnée dans le Tableau II.2 (cf Chapitre II) à 298K et pour le système le plus hydraté, on trouve un volume moléculaire moyen  $V_{PC}$  de  $1226 \text{ \AA}^3/\text{lipide}$  et une densité  $\rho$  de  $1,04 \text{ g.cm}^{-3}$ . Ces valeurs sont très proches de celles utilisées pour les calculs expérimentaux.

## II. Etude de la conformation des chaînes acyles

### 1. Détermination des paramètres d'ordre

#### *Définition du paramètre d'ordre*

Un paramètre d'ordre est une mesure qui permet de définir le degré d'ordre dans un système. C'est une donnée qui indique l'ordre d'orientation des chaînes carbonées du système. Il est déterminé de manière expérimentale via la RMN du proton sur des échantillons de bicouches orientées. A partir des trajectoires de dynamique moléculaire, il est également possible de déterminer le paramètre d'ordre,  $S_{CD}$ , selon la formule suivante [112] :

$$S_{CD}(\theta) = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

Équation 31

où  $\theta$  est l'angle entre le vecteur orienté le long de la liaison C – H du  $n$ ème carbone provenant de la chaîne acyle  $sn-1$  ou  $sn-2$  et la normale à la bicouche. Les crochets  $\langle \rangle$  signifient que le résultat est moyenné pour l'ensemble des lipides et dans le temps puisque l'analyse a été réalisée sur les 3 dernières ns toutes les 10 ps. Lorsque les liaisons C – H sont distribuées de façon uniforme, c'est-à-dire lorsque le désordre des chaînes est au maximum,  $S_{CD} = 0$ . Lorsque les chaînes sont à l'état all-*trans*, c'est-à-dire parfaitement ordonnées,  $|S_{CD}| = 0.5$ .

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

### *Description des résultats*

Les profils de paramètres d'ordre en fonction de la position du carbone pour les chaînes *sn-1* et *sn-2* des systèmes PC saumon, POPC et PDPC sont présentés en Figure III.21. Pour comparaison on reporte les résultats expérimentaux obtenus dans la littérature pour POPC et PDPC. Pour la chaîne palmitique en *sn-1*, les résultats expérimentaux proviennent de [13] et [12]. Pour la chaîne oléique en *sn-2*, les résultats expérimentaux proviennent de [14] et [15]. Enfin pour la chaîne DHA en *sn-2*, les résultats expérimentaux proviennent de [12]. Pour le système PC saumon, seuls les résultats obtenus par DM sont présentés et uniquement pour la chaîne palmitique en *sn-1*, oléique et DHA en *sn-2*. En effet, on estime que la chaîne palmitoléique (16 :1 n-9) va adopter un comportement similaire à la chaîne oléique puisque sa double liaison est située au niveau des mêmes carbones et la chaîne EPA aura un comportement similaire à la chaîne DHA du fait de ses nombreuses insaturations et sa longueur de chaîne. De plus, il a été démontré que l'introduction de la première insaturation dans l'une des deux chaînes carbonées entraînait le changement de comportement le plus conséquent vis-à-vis du paramètre d'ordre et que les l'ajout d'autres doubles liaisons n'influence que faiblement la variation du paramètre d'ordre [117].

Pour la chaîne *sn-1*, les résultats expérimentaux présentent des valeurs bien plus faibles que les résultats de simulation, même si l'allure générale du profil est similaire, avec une diminution progressive des valeurs jusqu'au carbone terminal qui tend vers 0. En effet, que ce soit en *sn-1* ou en *sn-2*, on observe une diminution progressive de l'ordre dans les chaînes vers le centre de la bicouche, c'est-à-dire au niveau du carbone du groupement méthyle terminal. Le dernier carbone étant très mobile (flexible) en raison de la seule liaison avec le reste de la chaîne, on retrouve un degré de liberté très élevé avec un paramètre d'ordre qui tend vers 0.

La différence provient très probablement du manque de précision dans le champ de force. En effet, Taylor et *al.* [210] ont démontré qu'une amélioration du champ de force aboutissait à une meilleure concordance des résultats entre expérience et simulation, laissant de légères différences pour les 4 premiers atomes de carbone de la chaîne.

### *Influence de l'insaturation sur l'ordre des chaînes*

On observe à partir des résultats expérimentaux et ceux de simulation que l'ajout des doubles liaisons sur la chaîne *sn-2* entraîne une diminution de l'ordre global en *sn-1*. Cette différence

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

reste néanmoins négligeable pour les résultats de simulation, surtout si on considère la variabilité liée à l'écart-type qui vaut en moyenne 0,02 (non présenté sur le graphe par souci de lisibilité). Ce phénomène a également été décrit par Holte et *al.* qui ont étudié l'influence du nombre d'insaturation en *sn-2* sur les paramètres d'ordre de plusieurs PC [113].

Les paramètres d'ordre en *sn-2* sont affectés par l'augmentation de l'insaturation sur les chaînes et cela se traduit par une diminution des valeurs, comme il l'a été expliqué précédemment. Contrairement aux résultats pour *sn-1*, les résultats de simulation sont conformes aux résultats expérimentaux obtenus avec PDPC et POPC [12], [13],[14]. Dans le cas de la chaîne de DHA, même les carbones proches de la tête polaire qui ne sont pas impliqués dans une double liaison présentent une diminution du paramètre d'ordre puisque les premiers carbones ont une valeur  $\approx 0,2$  dans le cas des chaînes saturées, alors que le DHA présente des valeurs proches de 0,1. Dans la région des trois premières doubles liaisons, on observe un enchaînement de pics de diminution et augmentation successives, qui sont corrélées à la position des insaturations. Après la troisième double liaison (entre C<sub>10</sub> et C<sub>11</sub>), SCD diminue jusqu'à  $\approx 0,5$  pour les carbones situés plus à l'intérieur de la bicouche mais le comportement n'est alors plus affecté par la position des doubles liaisons comme c'est le cas en début de chaîne.

Enfin, il est important de remarquer qu'aucune différence significative n'est observée entre les chaînes *sn-2* oléique et DHA du système PC saumon et les chaîne oléique et DHA de POPC et PDPC respectivement. Ce comportement indique que les propriétés de mouvements des chaînes acyles pour les lipides individuels dans le mélange de PC saumon sont les mêmes que lorsque ces derniers sont dans des membranes pures. Il n'y a donc pas d'influence observée de la présence de lipides différents se trouvant juxtaposés. Néanmoins, du fait de la présence des insaturations en *sn-2*, le système PC saumon présente un degré de mouvement de ses chaînes plus élevé que des systèmes moins insaturés comme le POPC.

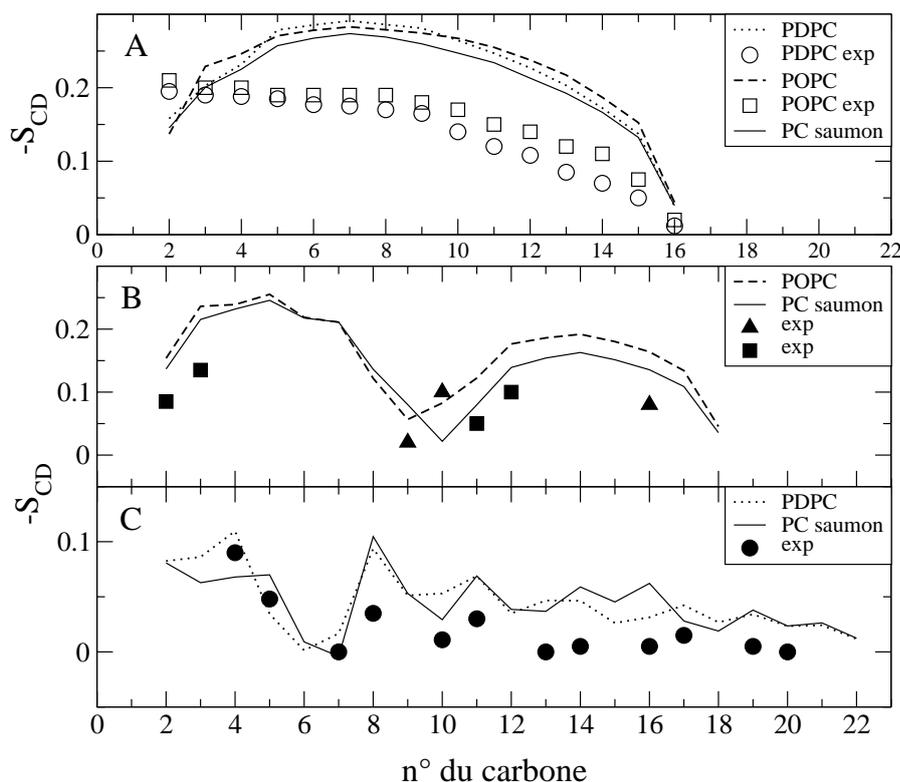


Figure III.21. Résultats expérimentaux et de simulation des paramètres d'ordre pour (A) les chaînes palmitoyl en  $sn-1$  pour les systèmes, PC saumon, POPC et PDPC ; (B) les chaînes oleyl en  $sn-2$  pour les systèmes POPC et PC saumon ; (C) les chaînes docosahexaenoyl pour les systèmes PDPC et PC saumon. Les résultats expérimentaux sont représentés par des symboles individuels : cercles vides pour la chaîne  $sn-1$  PDPC [12], carrés vides pour la chaîne  $sn-1$  POPC [13], carrés pleins [14] et triangles pleins [15] pour la chaîne  $sn-2$  POPC, cercles pleins pour la chaîne  $sn-2$  PDPC [12].

## 2. Etude de la répartition des dièdres dans les chaînes hydrocarbonées

Les paramètres d'ordre sont corrélés à la distribution trans-gauche des dièdres des chaînes acyles, même si cette relation est indirecte. C'est pourquoi l'étude simultanée de ces deux paramètres renseigne sur l'organisation globale des chaînes.

### *Description de la mesure d'un angle dièdre*

Les angles dièdres sont définis par quatre atomes de carbone consécutifs dans une des chaînes acyles et décrivent la rotation existant entre les deux atomes de carbone au milieu. Les différentes conformations adoptées par les angles de torsion sont désignées par les termes suivants : *cis* ( $0^{\circ}$ ), *gauche*<sup>+</sup> ( $60^{\circ}$ ), *skew*<sup>+</sup> ( $120^{\circ}$ ), *trans* ( $180^{\circ}$ ), *skew*<sup>-</sup> ( $240^{\circ}$ ) et *gauche*<sup>-</sup> ( $300^{\circ}$ ).

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

Cette description arbitraire suit la même que celle présentée par Hubert et *al.* [12]. De manière générale, on observe que les angles dièdres entourant un groupement méthylène (double liaison) sont préférentiellement de type gauche<sup>+</sup>, gauche<sup>-</sup> ou trans. Les doubles liaisons sont à l'état *cis* ou *trans*, même si à l'état naturel, elles apparaissent plus sous la conformation *cis* [22]. Comme il peut être extrêmement rare de trouver les valeurs exactes pour les angles, le calcul de la moyenne a pris en compte une fluctuation de  $\pm 30^\circ$  autour de la valeur correcte (par exemple, la conformation gauche<sup>+</sup> s'étend pour des valeurs d'angle comprises entre 30 et 90°). Enfin, les liaisons C-C situées autour d'une double liaison ont leur énergie la plus basse dans la conformation skew<sup>+</sup> ou skew<sup>-</sup>. Les résultats sont une moyenne déterminée à partir des probabilités de distribution réalisée sur les 4 dernières ns et toutes les 10 ps.

#### *Description des résultats*

La Figure III.22 présente les résultats des différentes distributions des angles dièdres obtenus pour trois chaînes du système PC saumon à 298K et hydratées à 37 molécules d'eau par lipide : acide palmitique, acide oléique et DHA. L'analyse a également été réalisée sur les systèmes POPC et PDPC ainsi que pour les autres systèmes PC saumon à différents taux d'hydratation et à 263K. Les résultats pour tous les systèmes sont présentés dans le Tableau III.13. La symétrie dans les courbes obtenues démontre qu'un état d'équilibre a été atteint même pour les chaînes polyinsaturées. En effet, on retrouve une proportion d'angles compris entre 0 et 180° (désigné par (+)) similaire à celle compris entre 180 et 360° (désigné par (-)). Les distributions pour les angles dièdres dans la chaîne palmitique (*sn-1*) adoptent un comportement typique de chaîne saturée en bicouche. Les courbes présentent un maximum à 60° et 300° pour la conformation gauche<sup>±</sup>. Celle-ci atteint les 20% environ, peu importe le système considéré. Dans le cas des chaînes contenant des insaturations (*sn-2*), la proportion de conformations *trans* et de skew dépend du nombre de doubles liaisons à l'intérieur de la chaîne. Pour une seule insaturation comme dans la chaîne oléique, on retrouve 15% en conformation skew et 54% en conformation *trans*. Avec une augmentation du nombre de doubles liaisons, la proportion de conformation skew augmente à 60% au détriment de la proportion de conformation *trans* qui tombe à 16%.

De précédentes études en DM sur la conformation du DHA ont défini une nomenclature pour différentes conformations d'un bout de chaîne du DHA correspondant à un fragment contenant trois doubles liaisons et deux paires de segments méthylène associés. Les



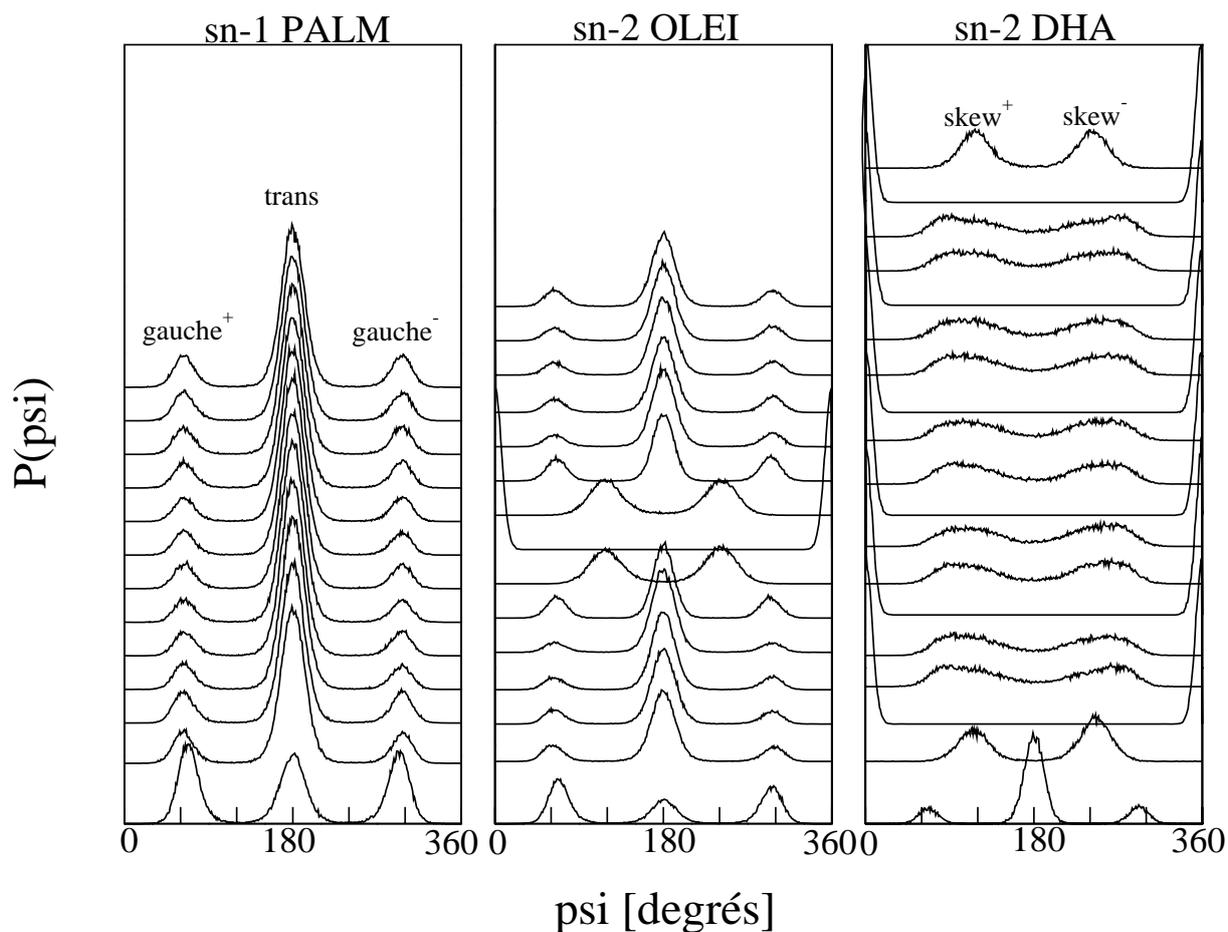


Figure III.22. Probabilité de distribution des angles de torsion pour les chaînes *sn*-1 acide palmitique, *sn*-2 acide oléique et DHA du système PC saumon. Résultats pour le système simulé à 298K et à 37 molécules d'eau par lipide. Les probabilités commencent pour les dièdres impliquant la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> à chaque cas.

Tableau III.13. Pourcentage moyen de conformations gauche<sup>+</sup>, skew<sup>+</sup>, *trans*, skew<sup>-</sup>, gauche<sup>-</sup> dans les chaînes palmitique, oléique et DHA des systèmes PC saumon, POPC et PDPC et 298K.

Chaîne	conformation	PC saumon	POPC	PDPC
<b>PALM</b>	gauche +	10,3	9,4	9,3
	<i>trans</i>	75,2	76,4	75,1
	gauche -	10,6	10,4	10,9
<b>DHA</b>	gauche +	12,9	-	13,1
	skew +	29	-	30
	<i>trans</i>	16,3	-	16,1
	skew -	30,2	-	28,3
	gauche -	13	-	12,9
<b>OLEI</b>	gauche +	11,9	12,4	-
	skew +	7,3	7,7	-
	<i>trans</i>	5,3	54,5	-

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

skew -	7,5	7,1	-
gauche -	12,4	11,6	-

---

#### 3. Hydratation des têtes polaires

##### *Présentation de la méthode*

L'étude de l'hydratation des têtes polaires a été réalisée en déterminant la fonction de distribution radiale (ou RDF pour Radial Distribution Function),  $g(r)$ , qui décrit la variation de la densité atomique en fonction de la distance par rapport à un atome particulier. La détermination de  $g(r)$  est similaire à la détermination des profils de densité. Elle consiste à comptabiliser les atomes d'oxygène des molécules d'eau les plus près des têtes polaires tout en segmentant le résultat obtenu de manière à avoir une distribution radiale en distance. Les résultats sont moyennés pour chaque lipide et dans le temps (l'analyse est réalisée sur les 3 dernières ns et toutes les 20 ps). Les résultats sont également normalisés de manière à ce que l'intégrale de la RDF sur tout le système donne le nombre total de molécule d'eau.

##### *Description des résultats*

La Figure III.23 présente les RDF des molécules d'eau (représentées ici par leur atome d'oxygène) autour des atomes d'azote, de phosphore et d'oxygène des têtes polaires des lipides, notés ici  $g_{\text{Now}}(r)$ ,  $g_{\text{Pow}}(r)$  et  $g_{\text{Oow}}(r)$  respectivement, pour les systèmes PC saumon, POPC et PDPC à 298K. La première observation qui ressort est qu'aucune différence notable n'est à constater entre les profils des différents systèmes, les pics se trouvent à la même position que ce soit pour les trois  $g(r)$ .

Par ailleurs, chaque profil présente un double pic, révélateur de la présence de deux couches d'eau successives au niveau de la région interfaciale. Concernant  $g_{\text{Now}}(r)$ , le premier pic est observé à  $r = 4,5 \text{ \AA}$  et l'intégration de la courbe pour la première couche d'hydratation (distance  $r \leq 5,75 \text{ \AA}$ ) donne 15,2 molécules d'eau par groupement choline. Pour  $g_{\text{Pow}}(r)$ , le premier pic observé à  $r = 4 \text{ \AA}$  est plus fin et donne lieu à une couche d'hydratation de 5,8 molécules d'eau par atome de phosphore. Enfin, pour  $g_{\text{Oow}}(r)$ , l'atome d'oxygène du groupement phosphate considéré correspond à un des deux atomes d'oxygène « libre », c'est-à-dire, non engagé dans une liaison. Dans ce cas, le premier pic atteint son maximum à  $r = 2,7 \text{ \AA}$  et l'intégration de la courbe pour  $r \leq 3,31 \text{ \AA}$  donne 2,29 molécules d'eau par atome d'oxygène. On peut déduire de ces résultats que l'atome N interagit faiblement avec les molécules d'eau puisque le premier pic se situe à un rayon de  $4 \text{ \AA}$  tandis que pour les atomes d'oxygène libre, le pic étant mieux défini et plus proche, on peut supposer la formation d'une première couche d'eau.

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés par Saiz et *al.* sur SDPC avec 16 molécules d'eau pour la première couche d'hydratation du groupement choline et 6,2 molécules d'eau pour le groupement phosphate [116] mais aussi avec les résultats de Belohorcova et *al.* sur DMPC [212].

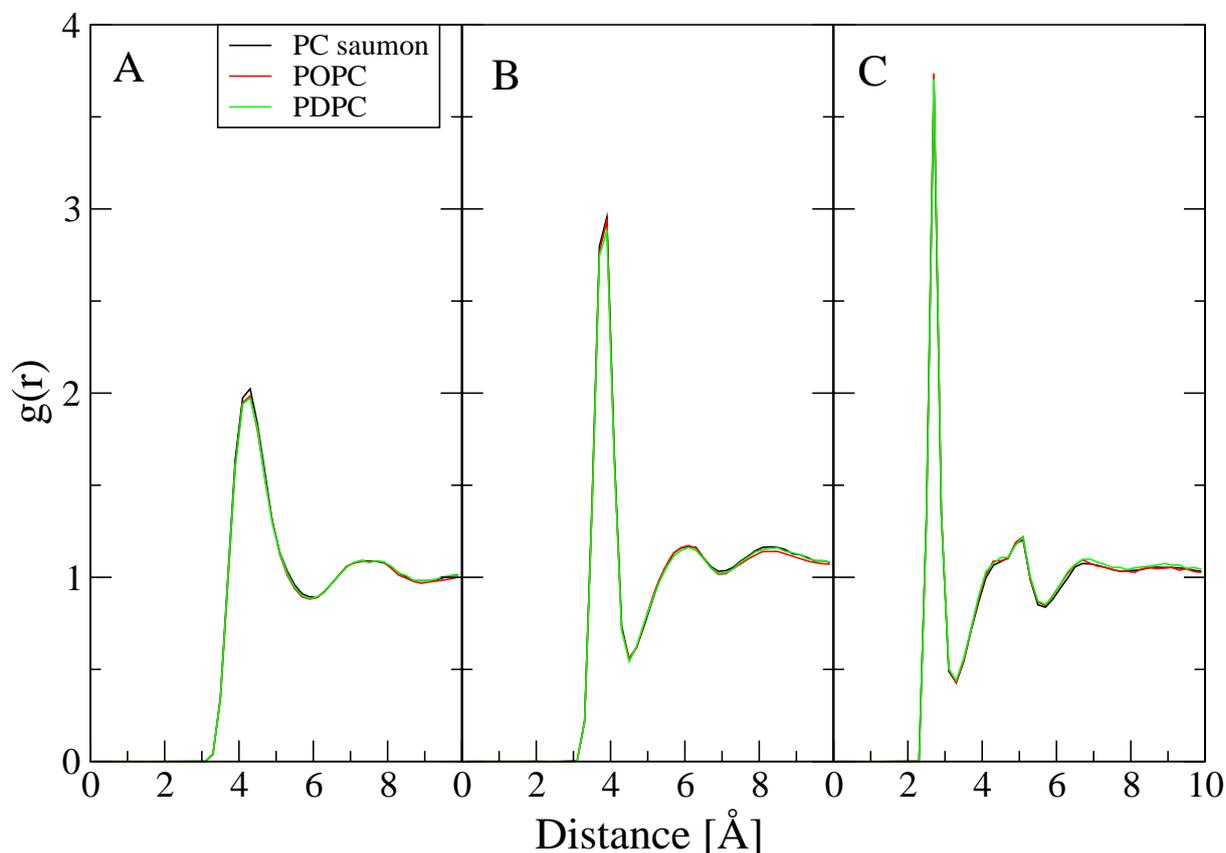


Figure III.23. Fonctions de distribution radiale correspondant aux molécules d'eau entourant (A) l'azote, (B) le phosphate et (C) l'oxygène des têtes polaires pour les systèmes PC saumon, POPC et PDPC à 298K.

### *Signification de la monocouche d'eau*

Du fait de la quasi-superposition des profils entre les systèmes, aucune différence n'est observée quant à la valeur du taux d'hydratation des têtes polaires. Ce résultat peut paraître surprenant puisque la modélisation mathématique des résultats expérimentaux (en utilisant la méthode DVS) a démontré que la PC de saumon avait une monocouche d'eau plus importante que la PC d'œuf et la PC de soja (respectivement 3,09, 2,44 et 2,26 molécules d'eau par lipide). Selon que l'on considère la première couche d'eau entourant l'atome d'azote, de phosphore ou d'oxygène, on obtient des valeurs de monocouche différant quelque peu de

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

celles obtenues par DVS. Ainsi, on peut se demander quelle est la signification physique des valeurs de monocouche d'eau déterminées expérimentalement et par simulation ?

Une autre approche expérimentale pour l'évaluation de la monocouche d'eau a été réalisée par Hristova et *al.* [213]. Ils ont mené une étude sur des bicouches de DOPC à différents taux d'hydratation par diffraction des rayons X et ont trouvé une « cassure » dans l'évolution de la distance de Bragg en fonction de l'hydratation. Ils ont suggéré que cette cassure, apparaissant à 12 molécules d'eau par lipide, représentait la couche d'hydratation du DOPC. Cette valeur se rapproche donc plus des valeurs pour la première couche d'hydratation entourant le groupement choline trouvées en simulation pour les trois systèmes.

Une autre étude en DM de Murzyn et *al.* sur l'hydratation de POPC a montré qu'il existe différentes couches d'eau entourant les têtes polaires [214]. Cette étude révèle que le nombre moyen de molécules d'eau constituant la première couche autour des atomes d'oxygène de la tête polaire était d'environ 5, ces molécules étant liées avec les atomes d'oxygène par des liaisons hydrogène. On peut donc supposer que la monocouche d'eau déterminée expérimentalement se rapproche plus de cette signification. Par ailleurs, le nombre moyen de molécules d'eau entourant le groupement choline est de 12, ces molécules formant cette fois ci une structure de type clathrate autour du groupement choline.

Enfin, il a clairement été montré dans les résultats expérimentaux que la présence des nombreuses insaturations dans la PC de saumon induisait une plus forte capacité d'hydratation pour cette dernière ce qui laisse à supposer que l'effet des doubles liaisons sur l'hydratation ne se ressent pas au niveau de la région interfaciale mais plus dans le film d'eau au niveau des couches les plus externes.

### III. Influence de l'hydratation sur les propriétés structurales des multicouches de phosphatidylcholine de saumon

#### 1. Objectifs de l'étude

La plupart des études sur les simulations en DM de bicouches lipidiques sont réalisées pour des systèmes dont le taux d'hydratation est compris entre 20 et 30 molécules d'eau, ce qui correspond à un état d'hydratation complète ou « full hydration ». Cependant, certaines propriétés membranaires telles que les propriétés structurales, dynamiques et

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

thermodynamiques [121], [208] sont dépendantes du taux d'hydratation, c'est ce qu'on appelle la méthode du stress osmotique. Un changement dans le taux d'hydratation influence également les propriétés mécaniques des membranes ainsi que leur comportement de phase. [191].

Les résultats expérimentaux de cette étude ont montré une propriété particulière de la part de la PC de saumon. En effet, il semble que pour ce système, une élévation du taux d'hydratation n'entraîne pas de changement dans l'aire par lipide alors que d'autres études sur des PC ont montré qu'une augmentation de la teneur en eau résultait en une augmentation de la surface moléculaire. Dans le cas de la PC de saumon, il semble que l'addition des molécules d'eau dans le système se ressentent essentiellement dans l'augmentation de l'épaisseur du film d'eau aux dépens d'un gonflement des lipides ce qui se traduit par une surface relativement constante. Ne pouvant expliquer ce phénomène en se basant uniquement sur les résultats expérimentaux, il a été décidé de simuler le système PC saumon à différents taux d'hydratation et d'examiner les mêmes propriétés que lorsqu'il est à l'état saturé en eau afin de comprendre les mécanismes d'influence de l'hydratation sur ce système.

### 2. Modification de l'aire par lipide

Les configurations initiales des systèmes à taux d'hydratation réduits ont été élaborées à partir du système à 37 molécules d'eau par lipide dont on a supprimé des molécules d'eau afin d'obtenir les taux désirés. Chaque système a ensuite nécessité une période d'équilibration où la distance de répétition finit par se stabiliser (Fig. III.24). Les résultats des distances de répétition et aire par lipide en fonction de l'hydratation sont présentés en Figure III.17 et Figure III.18, et comparés aux résultats expérimentaux. Les valeurs exactes sont reprises dans le Tableau III.14. Comme il l'a été mentionné précédemment, on remarque que l'aire par lipide reste plus ou moins constante autour de  $60 \text{ \AA}^2/\text{lipide}$  pour les systèmes hydratés entre 10 et 37 molécules d'eau par lipide. En revanche, le système le moins hydraté à 6 molécules d'eau par lipide présente une diminution significative de sa surface moléculaire moyenne à  $56,6 \pm 0,4 \text{ \AA}^2/\text{lipide}$ . D'autres études en DM ont montré une diminution progressive de l'aire par lipide avec une diminution de l'hydratation notamment pour DMPC qui passe de  $65,4 \text{ \AA}^2$  à  $60,7 \text{ \AA}^2$  pour une hydratation de 29 et 5 molécules d'eau par lipide respectivement [208]. Pour DOPC, la diminution de la surface est également progressive et va de  $67,6 \text{ \AA}^2$  à  $56,9 \text{ \AA}^2$  pour des hydratations de 30 à 5 molécules d'eau par lipide respectivement [215].

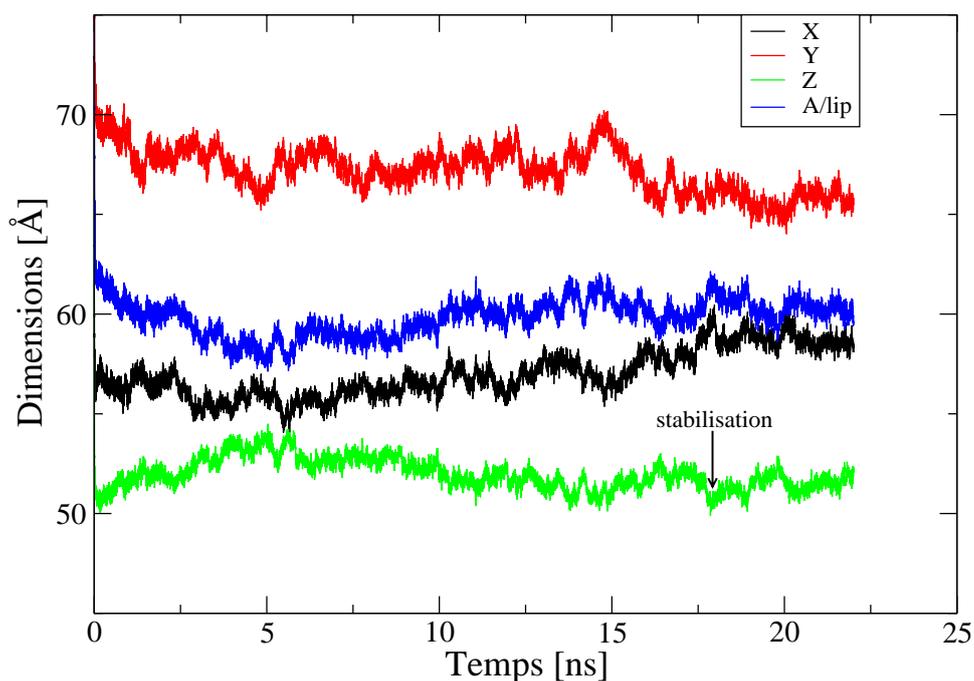


Figure III.24. Evolution des dimensions d'une cellule de simulation du système PC saumon hydraté à 10 molécules d'eau par lipide. La flèche correspond au temps de simulation à partir duquel on considère que le système est stable au niveau de l'évolution de la distance de répétition.

Tableau III.14. Récapitulatif des différents résultats de simulation pour le système PC saumon à différents taux d'hydratation et à 298K.

$\alpha$ (H <sub>2</sub> O/lip)	10	18	28	37
$d$ (Å)	$54,6 \pm 0,3$	$62,6 \pm 0,4$	$71,2 \pm 0,5$	$81,2 \pm 0,6$
Aire par lipide, A (Å <sup>2</sup> )	$55,3 \pm 0,3$	$55,8 \pm 0,3$	$56,9 \pm 0,4$	$56,0 \pm 0,4$
Epaisseur bicouche, $d_{H/H}$ (Å)	41,9	41,2	41,1	41,1
Epaisseur hydrophobe, $d_{H/C}$ (Å)	27,4	27,1	26,1	26
$g_{N-Ow}(r)$ (molécules d'eau/tête polaire)	15,1	15,9	16	16
$g_{P-Ow}(r)$ (molécules d'eau/tête polaire)	5,7	5,8	5,8	5,8
$g_{O-Ow}(r)$ (molécules d'eau/tête polaire)	2,0	2,3	2,3	2,3

### 3. Modification de la structure des bicouches

La Figure III.25 présente les différents profils de densité pour les différents composés des bicouches des systèmes PC saumon à 6, 10 et 28 molécules d'eau par lipide et à 298K. La déshydratation de 28 à 10 molécules d'eau entraîne principalement l'élimination des molécules d'eau provenant du film aqueux entre les bicouches. Au plus faible taux d'hydratation, il n'y a plus assez de molécules d'eau pour hydrater les têtes polaires. Pour les systèmes à 6 et 10 molécules d'eau, les profils des groupements de la tête polaire et de l'eau ont également été présentés pour les bicouches images obtenues grâce aux conditions périodiques aux limites. Ceci pour observer que déshydratation poussée entraîne un chevauchement des têtes polaires au niveau des groupements choline notamment puisque les molécules d'eau ne peuvent plus séparer les bicouches adjacentes.

De plus, pour les systèmes à 6 et 10, les molécules d'eau présentent une densité maximale plus faible que pour l'eau dite libre qui affiche une densité de 0,033 molécules d'eau/Å<sup>3</sup>. Il semble que la déshydratation affecte principalement l'organisation des têtes polaires puisqu'une augmentation de  $d_{H/H}$  est observée (de  $\approx 40,8$  Å à 42,6 Å) alors que la distance hydrophobe  $d_{HC}$  reste inchangée (autours de 26,9 Å). Tout comme pour l'aire par lipide,  $d_{HC}$  demeure constante malgré l'augmentation de la teneur en eau, comme observé avec les résultats expérimentaux.

A la lumière de ces résultats, on peut penser que lorsque le système PC saumon est fortement déshydraté (jusqu'à 6 molécules d'eau par lipide), il se produit un changement d'état de la phase  $L_\alpha$  à la phase gel  $L_\beta$ . En effet, la diminution brusque de l'aire par lipide ainsi que l'augmentation de la longueur des bicouches (Tableau III.16) sont caractéristiques d'une évolution du système en phase gel. De plus, il a déjà été montré qu'une telle transition de phase est possible, on parle alors de transition de phase lyotropique. Ce phénomène a été observé expérimentalement avec des membranes PC contenant des insaturations en *sn-2* par la méthode de stress osmotique. C'est le cas de Binder et *al.* qui ont montré une diminution de l'aire par lipide pour des bicouches SDPC de 62 Å<sup>2</sup> à 49 Å<sup>2</sup> lorsque  $\alpha$  décroît respectivement de 12 à 3 molécules d'eau par lipide [121]. Pour le système DMPC, la déshydratation des bicouches a causé une diminution de l'aire par lipide de 63,1 Å<sup>2</sup> à 57,9 Å<sup>2</sup> pour des teneurs en eau allant respectivement de l'état saturé à 5 molécules d'eau par lipide [208]. Or, les résultats expérimentaux pour DMPC de surfaces moléculaires en phase  $L_\alpha$  et  $L_\beta$  sont respectivement de

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

62,6 Å<sup>2</sup> [153] et 47 Å<sup>2</sup> [216]. Dans ce cas, on peut supposer que les bicouches de DMPC à 5 molécules d'eau par lipide ne sont pas encore à l'état de gel puisque l'aire par lipide retrouvée est nettement supérieure à l'aire par lipide en phase L<sub>β</sub> expérimentale. La diminution de la surface moléculaire sous l'influence de la déshydratation est nettement plus prononcée pour SDPC que pour DMPC, probablement à cause de la présence des chaînes insaturées qui, en état fluide, se développent plus et occupent un espace plus important. C'est pourquoi on peut penser que les bicouches de PC saumon, composées de chaînes mixtes saturées/mono- ou polyinsaturées, devraient aborder un comportement similaire et donc une diminution de l'aire par lipide plus prononcée en phase gel.

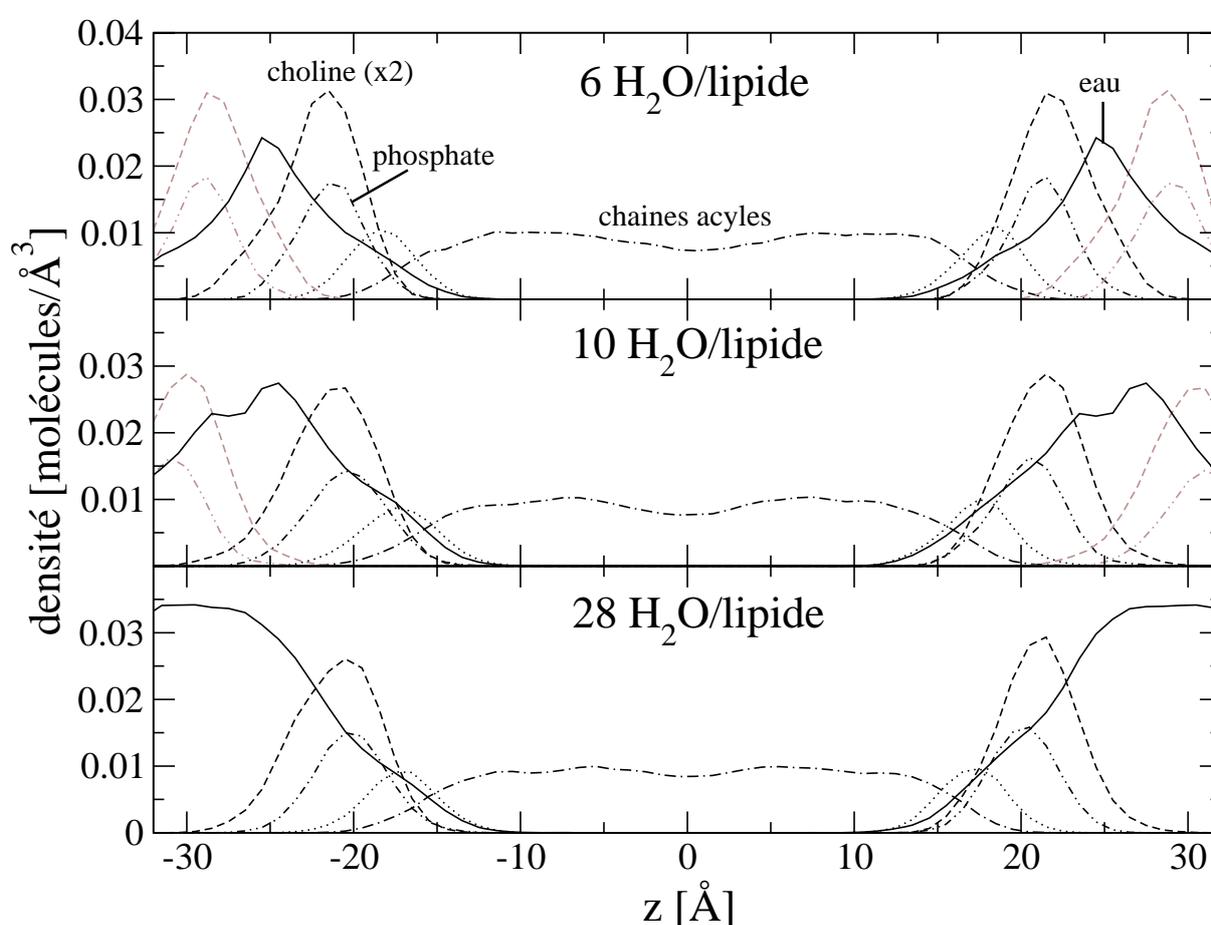


Figure III.25. Profil de densité du système PC saumon hydraté à 6, 10 et 28 molécules d'eau par lipides à 298K. Voir légende de la Fig. III.19 pour le détail des groupements présentés. Par souci de clarté, les profils du groupement choline ont été multipliés par 2. Les profils représentés en brun à 6 et 10 molécules d'eau par lipide correspondent aux images des bicouches obtenues grâce aux conditions périodiques aux limites pour les groupements choline et phosphate.

### 4. Effet sur l'organisation des chaînes carbonées

#### *Paramètres d'ordre*

La Figure III.26 présente l'influence du taux d'hydratation sur la structure des chaînes carbonées pour le système PC saumon. Seuls les résultats pour les chaînes les plus représentatives sont reportés, c'est-à-dire pour l'acide palmitique, l'acide oléique, l'EPA et le DHA. Il semble d'après les résultats que la déshydratation des bicouches n'ait pas d'effet sur l'ordre moyen des chaînes puisque si l'on prend en compte la variabilité des résultats (ces derniers sont moyennés sur une période de 3 ns et la fréquence d'analyse est de 20 ps), on peut considérer que les profils sont superposables. Or, dans son étude sur DMPC, Högberg *et al.* ont observé un effet significatif de la déshydratation sur l'ordre des chaînes saturées caractérisé par une augmentation des valeurs, ce qui traduit une augmentation dans l'ordre global [208]. Les chaînes insaturées en *sn-2* n'apparaissent pas être affectées non plus par le taux d'hydratation des systèmes. En effet, les profils ne sont pas superposables pour la chaîne EPA mais aucune tendance particulière semble se dégager des différents profils tandis que pour les chaînes DHA et oléique, les profils sont quasi superposables entre les différents taux d'hydratation.

Si l'on maintient l'hypothèse d'un début de transition lyotropique pour le système à 6 molécules d'eau par lipide, on devrait observer une différence dans les paramètres d'ordre avec une augmentation des valeurs, au moins pour les chaînes saturées. Ceci suggère l'hypothèse d'une forte relation existant entre la présence des AGPI-LC dans le système PC saumon et l'influence sur l'ordre global des chaînes et que, même lorsque l'aire par lipide moyenne diminue, le désordre dans les chaînes reste inchangé.

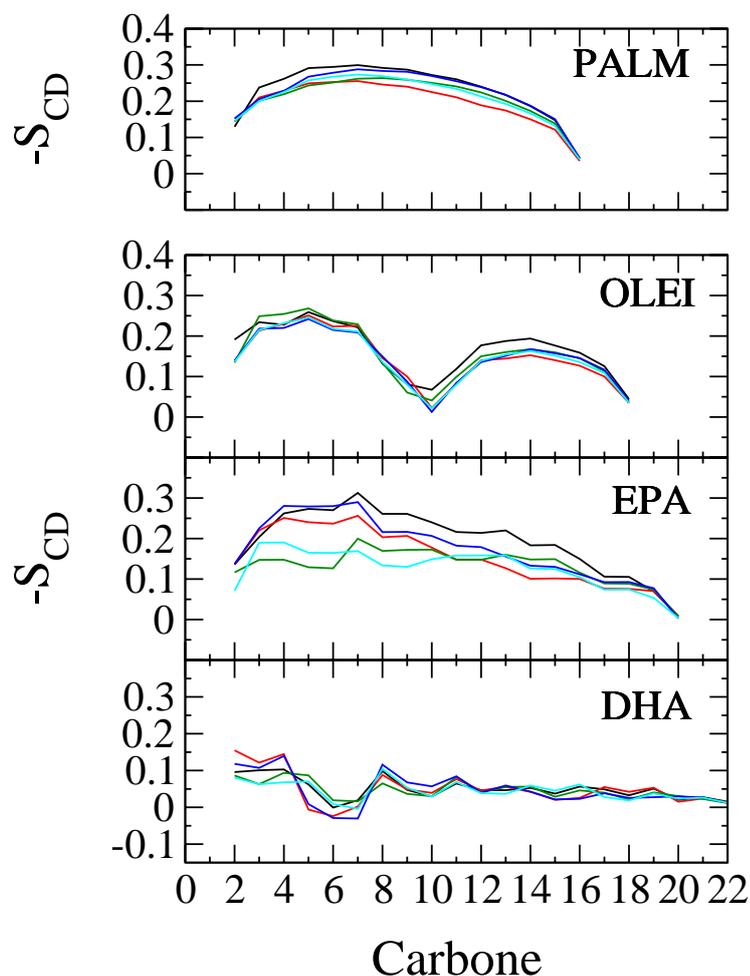


Figure III.26. Paramètres d'ordre pour les systèmes PC saumon à 298K et à différents teneurs en eau : 6 (noir), 10 (rouge), 18 (vert), 28 (bleu) et 37 (cyan) molécules d'eau par lipide. Les niveaux supérieurs correspondent aux chaînes palmitiques (PALM) en *sn*-1 et les graphes du dessous aux chaînes oléiques (OLEI), DHA et EPA en *sn*-2.

#### Angles de torsion

Tout comme pour le degré d'ordre des chaînes, la déshydratation ne semble pas affecter la conformation des chaînes puisque les proportions entre les différentes conformations restent du même ordre et ce, quel que soit le taux d'hydratation. En effet, dans cette analyse, l'état de gélification observé devrait se caractériser par une augmentation de la conformation *trans* dans les angles dièdres mais ce n'est pas le cas ici.

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Au final, on peut se demander quelle est la nature de la phase obtenue après la transition de phase lyotropique. Car les lipides n'adoptent clairement pas une conformation gel  $L_{\beta}$  mais plus une phase similaire à la phase cristal  $L_c$ . Or, la distinction majeure entre une phase gel  $L_{\beta}$  et une phase cristal  $L_c$  réside principalement dans la dynamique des lipides. Alors que les lipides sont essentiellement gelés en phase  $L_c$ , la phase  $L_{\beta}$  est caractérisée par des taux rapides de diffusion latérale, qui sont seulement d'ordre 1 voire 2 fois inférieurs à ceux de la phase cristal liquide [217]. Dans notre étude, la dynamique des lipides n'a pas été étudiée, que ce soit expérimentalement ou par simulation ce qui fait qu'on ne peut qu'émettre l'hypothèse d'une transition à faible taux d'hydratation.

Tableau III.15. Pourcentage moyen de conformations gauche<sup>+</sup>, skew<sup>+</sup>, trans, skew<sup>-</sup>, gauche<sup>-</sup> dans les chaînes palmitique, oléique et DHA des systèmes PC saumon à 6, 10, 28 et 37 molécules d'eau par lipide et 298K.

Chaîne	Conformation	$\alpha$ (H <sub>2</sub> O/lipide)			
		6	10	28	37
<b>PALM</b>	gauche <sup>+</sup>	9,7	10	10,2	10,3
	trans	76,5	75,7	75,4	75,2
	gauche <sup>-</sup>	10	10,4	10,6	10,6
<b>DHA</b>	gauche <sup>+</sup>	12,8	13	13	12,9
	skew <sup>+</sup>	30,1	29,8	28,8	29
	trans	16,4	16,3	16,2	16,3
	skew <sup>-</sup>	29,1	29,2	30,3	30,2
	gauche <sup>-</sup>	13,1	13,2	13,1	13
<b>OLEI</b>	gauche <sup>+</sup>	12,5	12,7	12,5	11,9
	skew <sup>+</sup>	7,6	7,6	7,7	7,3
	trans	54,2	54,1	54,5	54,3
	skew <sup>-</sup>	7,2	7,3	7,1	7,5
	gauche <sup>-</sup>	11,8	11,7	11,6	12,4

### 5. Hydratation des têtes polaires

La Figure III.27 présente l'influence du taux d'hydratation des membranes de PC saumon sur l'hydratation des têtes polaires. Le degré d'hydratation moyen de la bicouche n'influence pas l'organisation des molécules d'eau à l'interface puisqu'aucun décalage dans les pics n'est à observer malgré la déshydratation. A partir de 10 molécules d'eau par lipide, une diminution dans la hauteur des pics concernant les premières couches d'hydratation sont observées, que

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

ce soit pour la choline et pour le groupement phosphate. Il en ressort une légère diminution du nombre moyen de molécules d'eau entourant ces différents groupements qui est de 15,2 molécules d'eau à 14,7 puis 11,9 molécules d'eau autour de chaque choline pour des systèmes hydratés respectivement à 28, 10 et 6 molécules d'eau par lipide. Pour la première couche de solvatation du phosphate, la déshydratation se ressent principalement pour le plus faible taux d'hydratation où le nombre de molécules d'eau par phosphate décroît de 5,7 pour les systèmes saturés en eau à 4,9 molécules d'eau pour le système à 6 molécules d'eau par lipide. Ce dernier a donc la majorité des molécules d'eau disponible pour chaque lipide qui sont présentes autour du phosphate laissant l'extrémité choline non hydratée ou hydratée via les molécules d'eau des membranes adjacentes. Ce phénomène implique que pour le système dont le taux d'hydratation est très faible, les distances de répétitions sont fortement réduites et il existe une corrélation très forte entre les têtes polaires des bicouches voisines. Physiquement, ces corrélations sont causées par des interactions électrostatiques fortes dues à des plus faibles séparations entre les bicouches. Cette théorie a également été proposée dans l'étude de la distribution spatiale de bicouches DMPC hydratées à 5 molécules d'eau par lipide [208].

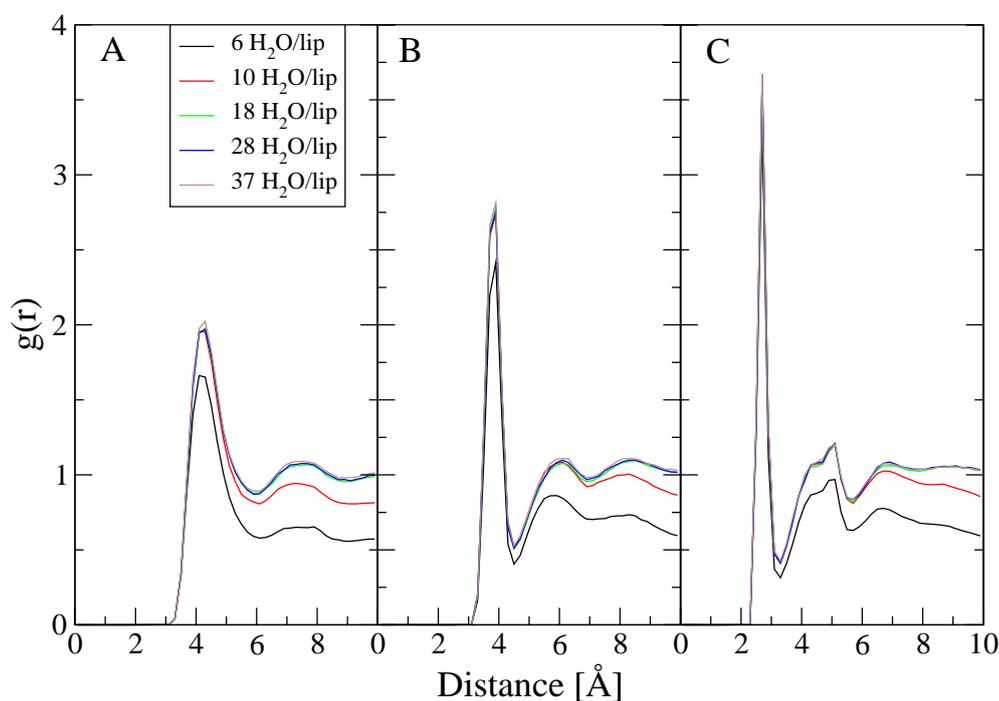


Figure III.27. Fonctions de distribution radiale correspondant aux molécules d'eau entourant (A) l'azote, (B) le phosphate et (C) l'oxygène des têtes polaires pour les systèmes PC saumon hydratés à 6, 10, 18, 28 et 37 molécules d'eau par lipide.

### IV. Etude de la phosphatidylcholine de saumon à 263K, vers un état de gel ?

Dans les résultats expérimentaux, il a été montré que la température de transition de phase  $T_m$  était dépendante du taux d'hydratation et que, dans le cas de la PC de saumon,  $T_m$  augmentait avec le taux d'hydratation. Pour les simulations réalisées à 263K, en se référant aux résultats du Tableau III.8, seuls les systèmes ayant un taux d'hydratation supérieur à 20 molécules d'eau par lipide se trouvent en théorie à l'état de gel. Les autres devraient toujours être en phase liquide cristal.

Or, les quatre systèmes de PC saumon simulés à 263K présentent une aire par lipide très similaire à celle obtenue par déshydratation poussée. En effet, on passe de  $55,3 \pm 0,3 \text{ \AA}^2$  à 10 molécules d'eau par lipide à  $56,0 \pm 0,3 \text{ \AA}^2$  à 37 molécules d'eau par lipide (Tableau III.16). La même caractéristique d'une surface moléculaire constante malgré la variation du taux d'hydratation est obtenue à 263K ce qui indique que ce phénomène s'applique à la fois en phase gel et phase liquide cristal. Cependant, il semble que le degré d'hydratation des bicouches influe sur l'épaisseur hydrophobe où la diminution de  $\alpha$  entraîne une augmentation de l'épaisseur. De plus, la distance de répétition des bicouches est également légèrement supérieure à celle obtenue à 298K ce qui peut laisser penser que les quatre systèmes ont débuté une réorganisation à l'intérieur des bicouches similaire à une transition vers la phase  $L_\beta$ .

Afin de vérifier si la transition est effective, il est nécessaire de s'intéresser à l'organisation des chaînes carbonées. Pour cela, les paramètres d'ordre ainsi que la détermination des angles dièdres ont également été effectués pour les systèmes de PC saumon à 10, 18, 28 et 37 molécules d'eau par lipide à 263K. Le système à 6 molécules d'eau par lipide présentant déjà une réorganisation à 298K due à la déshydratation poussée, il n'a pas été simulé et analysé à 263K.

La Figure III.28 présente les résultats des différents paramètres d'ordre des chaînes palmitique, oléique, EPA et DHA à 263K et pour différents taux d'hydratation. La même observation qu'à 298K peut être faite ici à savoir que pour les chaînes palmitique et oléique, ni la diminution de température, ni le taux d'hydratation ne semblent affecter les paramètres d'ordre. Pour des PC contenant des chaînes saturées cependant, il apparaît qu'une baisse de

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

température provoque une augmentation du paramètre d'ordre liée à une baisse de la mobilité des chaînes dû à la transition en phase gel [208]. En revanche, les chaînes insaturées présentent un désordre plus faible avec la baisse de température, notamment pour la chaîne de DHA puisque les variations de  $S_{CD}$  pour les premiers carbones sont plus importantes qu'à 298K et s'éloignent ainsi de 0. Ce phénomène concerne les carbones impliqués dans une double liaison et peut donc être le résultat d'une différence d'orientation des atomes d'hydrogène des deux cotés d'un segment méthylène. Pour la chaîne EPA, les résultats diffèrent considérablement suivant le degré d'hydratation des systèmes principalement pour les carbones situés en milieu de chaîne. Cependant, il semble qu'aucune tendance générale ne se dégage.

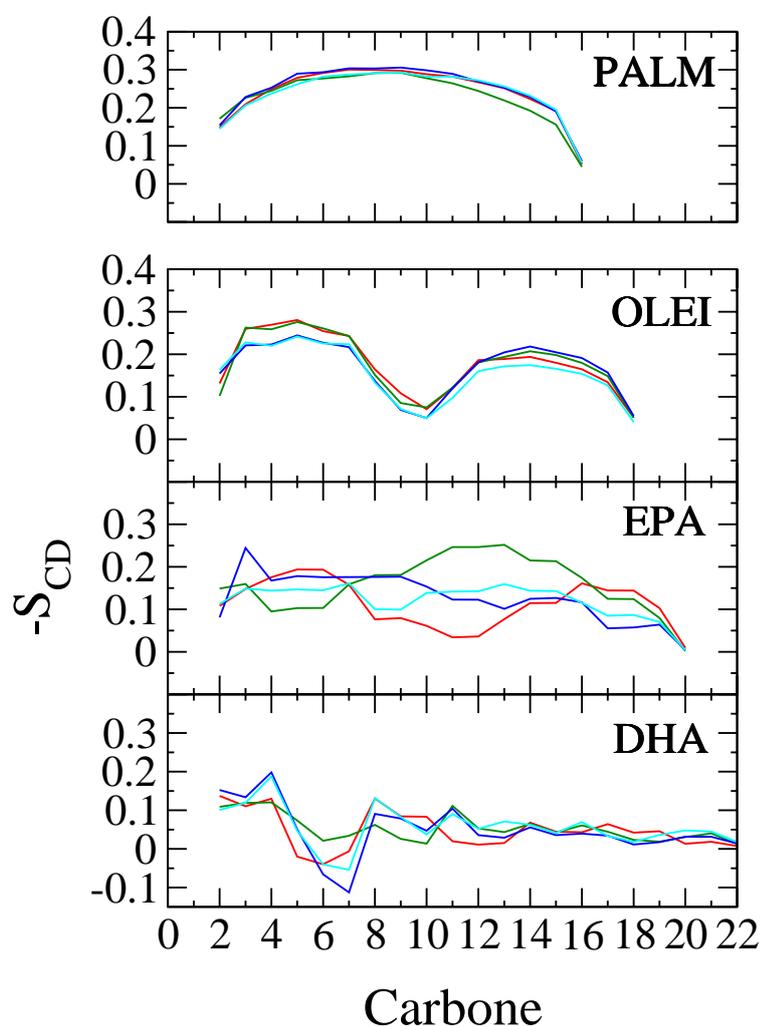


Figure III.28. Paramètres d'ordre pour les systèmes PC saumon à 263K et à différentes teneurs en eau : 10 (rouge), 18 (vert), 28 (bleu) et 37 (cyan) molécules d'eau par lipide. Les niveaux supérieurs correspondent aux chaînes palmitiques (PALM) en *sn*-1 et les graphes du dessous aux chaînes oléiques (OLEI), DHA et EPA en *sn*-2.

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

Dans une étude expérimentale de bicouches contenant du DHA en *sn*-2 et un acide gras saturé en *sn*-1 de longueur variable, Petrache et *al.* ont démontré l'influence de la température sur l'organisation des chaînes où une diminution de la température entraîne une augmentation de  $S_{CD}$  pour la chaîne saturée et ce, quelle que soit la longueur de la chaîne en *sn*-1 [111]. Une étude systématique de la baisse de température sur le système PC saumon permettrait de vérifier si ce phénomène s'applique également pour ce système.

L'influence principale de la baisse de température sur l'hydratation des têtes polaires réside en une légère augmentation de la solvation au niveau du groupement choline (Tableau III.17). Le premier et le second pic du  $g_{Pow}^{\otimes}$  ont des hauteurs similaires qu'à 298K et aucun changement n'est à observer pour l'hydratation du groupement phosphate. Sum et *al.* ont trouvé des caractéristiques similaires sur des systèmes DPPC à différentes températures et ont suggéré que ces résultats étaient le témoin d'une transition de phase naissante [218]. Malgré la diminution marquée de la surface moléculaire des différents systèmes à 263K, l'hydratation des têtes polaires est légèrement accrue ce qui peut être le résultat d'une réorganisation des molécules d'eau autours des têtes polaires qui adoptent une structure de type cristal dont la conformation nécessite moins d'espace.

Tableau III.16. Récapitulatif des différents résultats de simulation pour le système PC saumon à différents taux d'hydratation et à 263K.

$\alpha$ (H <sub>2</sub> O/lipide)	10	18	28	37
<b>distance de répétition, <math>d</math></b> (Å)	54,6 ± 0,3	62,6 ± 0,4	71,2 ± 0,5	81,2 ± 0,6
<b>Aire par lipide, <math>A</math></b> (Å <sup>2</sup> )	55,3 ± 0,3	55,8 ± 0,3	56,9 ± 0,4	56,0 ± 0,4
<b>Epaisseur bicouche, <math>d_{HH}</math></b> (Å)	41,9	41,2	41,1	41,1
<b>Epaisseur hydrophobe, <math>d_{HC}</math></b> (Å)	27,4	27,1	26,1	26
<b><math>g_{Now}^{\otimes}</math> (molécules d'eau/tête polaire)</b>	15,1	15,9	16	16
<b><math>g_{Pow}^{\otimes}</math> (molécules d'eau/tête polaire)</b>	5,7	5,8	5,8	5,8

En conclusion, de manière générale la phase gel  $L_{\beta}$  diffère de la phase liquide cristal  $L_{\alpha}$  par plusieurs points clé [103], [81] : (1) l'aire par lipide diminue, (2) les chaînes d'acides gras sont complètement étendues avec seulement quelques conformations gauche restantes, (3) les

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

lipides sont ordonnés de façon hexagonal et (4) la mobilité latérale des lipides est fortement réduite. Dans cette étude, seuls les deux premiers points ont été étudiés pour les systèmes PC saumon à différents taux d'hydratation et à 263K. Il semble que malgré une diminution marquée de l'aire par lipide et ce, quelle que soit l'hydratation des systèmes, les bicouches soient toujours en phase  $L_{\alpha}$  comme l'indique les résultats sur l'étude de l'organisation des chaînes acyles puisque l'ordre global des chaînes n'a pas varié et que les proportions de conformation *trans* n'ont que légèrement augmenté par rapport aux résultats obtenus à 298K, avec +5% de conformations *trans* observés pour les systèmes à 263K (Tableau III.17). On ne peut donc pas conclure que les bicouches de PC saumon étudiés à 263K pendant ce laps de temps sont en état de gel mais plutôt en phase  $L_{\alpha}$  très refroidie. De plus, on ne dispose pas de résultats expérimentaux sur la structure de la phase gel de la PC de saumon c'est pourquoi d'un point de vue simulation, on ne sait pas comment agencer les lipides de taille différente (lorsqu'ils sont en configuration all-*trans*) dans une même bicouche. La dynamique moléculaire n'est pas l'outil idéal pour déterminer la structure de phase gel lorsque celle-ci est inconnue, en revanche, elle peut apporter des informations complémentaires sur les mécanismes thermodynamiques impliqués dans la transition de phase.

Peu d'études en dynamique moléculaire (DM) sont à recenser sur la transition de phase cristal liquide – gel. La phase gel a été étudiée pour quelques systèmes en DM mais dans des configurations de départ préétablies [219], [197]. En se basant sur des résultats précédents d'étude de transition de phase obtenus en modèle gros grain (taille des systèmes et temps de simulations accrus par rapport à des études tout atome), on peut penser qu'il serait plus efficace de diminuer encore la température de simulation (pour être au minimum 15°C en dessous de  $T_m$ ) et d'augmenter les temps de simulation, la formation des premiers domaines en phase gel étant observés à partir de 60 ns [217]. L'évaluation de  $T_m$  par simulation en DM reste délicate en raison d'une faible cinétique associée à la transition de phase, notamment pour des températures proches de  $T_m$  ainsi qu'aux limites du champ de force capable de reproduire la thermodynamique de processus de transition [220]. Or, les résultats à 298K pour l'étude des paramètres d'ordre des chaînes ont montré une légère faiblesse du champ de force pour reproduire les résultats expérimentaux. On peut penser que pour un système composé de plusieurs lipides différents ayant chacun des  $T_m$  variable, la détermination de la température exacte de transition de phase par DM peut s'avérer encore plus difficile.

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau III.17. Pourcentage moyen de conformations gauche<sup>+</sup>, skew<sup>+</sup>, trans, skew<sup>-</sup>, gauche<sup>-</sup> dans les chaînes palmitique, oléique et DHA des systèmes PC saumon à 10, 28 et 37 molécules d'eau par lipide et 263K.

Chaîne	Conformation	$\alpha$ (H <sub>2</sub> O/lipide)		
		10	28	37
<b>PALM</b>	gauche <sup>+</sup>	7,9	7,5	7,8
	trans	81,6	81,8	80,9
	gauche <sup>-</sup>	8,1	8,3	8,8
<b>DHA</b>	gauche <sup>+</sup>	11,5	13,5	11,5
	skew <sup>+</sup>	28,1	31,2	26,7
	trans	14,6	15,4	15
	skew <sup>-</sup>	32,2	28,8	33,6
	gauche <sup>-</sup>	15,2	12,5	14,9
<b>OLEI</b>	gauche <sup>+</sup>		11,7	11,6
	skew <sup>+</sup>		7,2	6,4
	trans		57,7	57,1
	skew <sup>-</sup>		6,9	7,6
	gauche <sup>-</sup>		10	10,7

### V. Etude de la phosphatidylcholine en monocouche

L'étude de la PC de saumon en monocouche a été réalisée par le biais de plusieurs simulations du système PC saumon se différenciant par les configurations initiales qui présentaient des surfaces moléculaires différentes. En effet, le but était de reproduire l'isotherme de pression obtenu expérimentalement par compression d'un film monomoléculaire de PC saumon. Pour ce faire, le système initial de PC saumon a été soumis à plusieurs tensions de surface (positives et négatives) afin d'augmenter ou de diminuer la surface moléculaire moyenne.

La tension de surface a été déterminée par la relation suivante :

$$\pi = \gamma_w - \gamma_m \quad \text{Équation 32}$$

où  $\gamma_w$  est la tension de surface à l'interface air/eau et  $\gamma_m$  la tension de surface de la monocouche (voir partie Méthodes).

Chaque système a ensuite été simulé à température et volume constants de manière à ne pas faire varier l'aire par lipide mais adapter la pression du système. On estime qu'à la fin de chaque trajectoire de 8 ns, la pression est stabilisée.

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

### 1. Choix du modèle de l'eau

La tension à l'interface air/eau  $\gamma_w$  a été calculée à partir de la simulation d'une boîte d'eau composée de 826 molécules d'eau à 298K. Un premier essai a été réalisé avec le modèle TIP3 et la tension trouvée était de  $54,8 \pm 8,1$  mN/m, ce qui diffère de la valeur expérimentale à même température qui est de 72,0 mN/m. D'autres auteurs ont eu le même problème en tentant de déterminer une valeur de  $\gamma_w$  à partir d'une simulation de boîte d'eau TIP3 et ont décidé pour leur étude de prendre la valeur expérimentale pour ne pas sous-estimer les valeurs de pression de surface [16],[221]. Cependant, un deuxième essai avec le modèle SPCE a donné une tension de surface de  $65,0 \pm 10,3$  mN/m. Cette valeur est toujours plus faible que la valeur expérimentale mais en meilleur accord avec cette dernière. Nous avons estimé qu'il était plus raisonnable d'utiliser cette valeur plutôt que la valeur expérimentale puisqu'on peut souligner un manque de pertinence à utiliser deux valeurs de tension obtenues dans des conditions totalement différentes.

### 2. Comparaison des isothermes de compression

Une comparaison de la pression de surface en fonction de la surface moléculaire déterminée expérimentalement et par simulation est présentée en Figure III.29 pour la PC de saumon à 298K et, à titre comparatif, pour DPPC à 323K. Pour la PC de saumon, trois régions sont observées. Pour des surfaces moléculaires comprises entre 120 et 70 Å<sup>2</sup>, les monocouches sont à l'état expansé et donnent lieu à des pressions négatives puisque les tensions de surface des monocouches sont plus grandes que  $\gamma_w$ . Pour les surfaces comprises entre 60 et 53 Å<sup>2</sup>, les pressions de surface obtenues par simulation sont en accord avec les données expérimentales, celles-ci étant légèrement supérieures puisque  $\gamma_w$  expérimental étant également légèrement supérieur  $\gamma_w$  obtenue avec le modèle SPCE. Pour les simulations aux surfaces les plus faibles (40 et 45 Å<sup>2</sup>), les monocouches sont à l'état condensé où on peut observer un chevauchement partiel des lipides (Figure III.29).

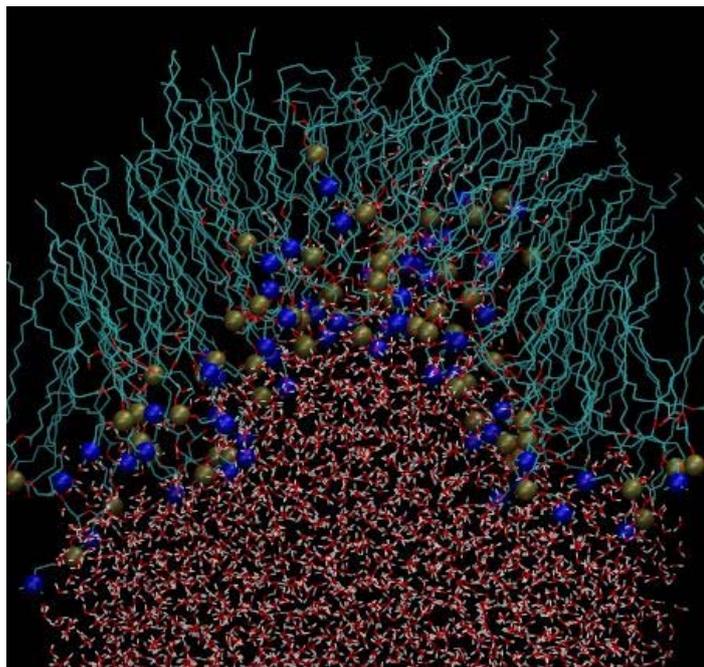


Figure III.29. Photo instantanée d'une monocouche de PC saumon simulée à l'interface air/eau et dont l'aire par lipide est de  $45 \text{ \AA}^2/\text{lipide}$ .

Dans cette région, les tensions de surface des monocouches changent de signe et atteignent des valeurs très négatives ce qui conduit à des pressions de surface très élevées. Les monocouches avec des tensions de surface négative sont très instables. Dans les simulations, les monocouches sont piégées à l'interface dans une géométrie écrasée et ne peuvent pas s'effondrer puisque le volume de la boîte de simulation reste constant. Cependant, la taille des systèmes est trop petite pour donner lieu à des déplacements de lipides hors-du-plan (recourbement de la monocouche) entraînant une instabilité du système.

La taille limitée des monocouches modélisées peut également être la cause des valeurs fortement positives et fortement négatives, se traduisant par une pente de courbe très élevée de part et d'autre de la zone  $40\text{-}60 \text{ \AA}^2$ . En effet, il a été démontré que la pente de l'isotherme, et donc la vitesse de changement de configuration sous l'effet d'une compression, était proportionnelle au module de compressibilité de la monocouche [222]. Ce dernier est plus important pour les petits systèmes du fait des ondulations qui ne sont plus présentes et de l'augmentation de la symétrie avec les conditions périodiques aux limites.

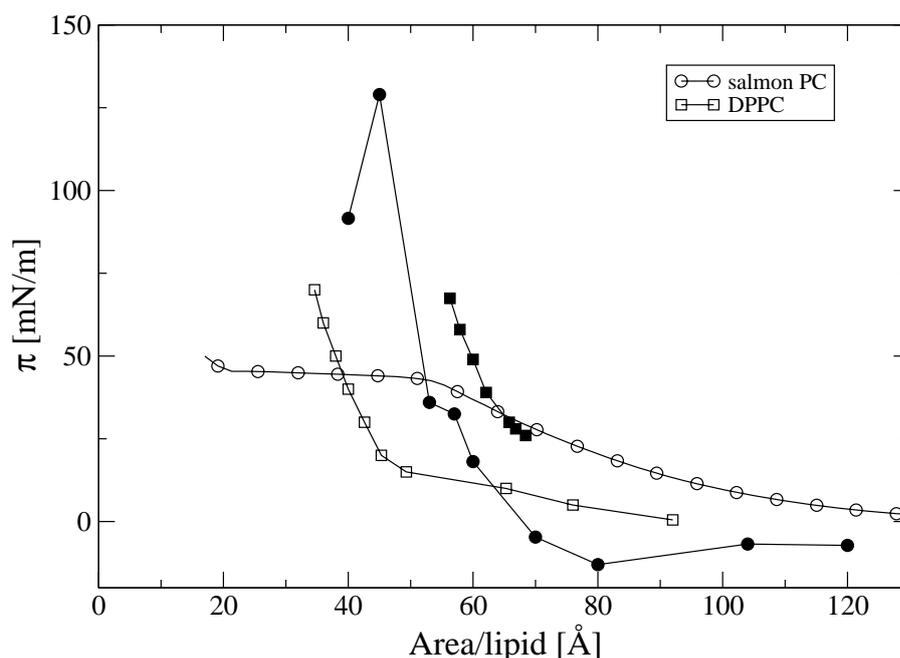


Figure III.30. Comparaison entre les isothermes de pression-surface moléculaire obtenus par simulation (symboles remplis) et par mesures expérimentales (symboles vides) pour la PC de saumon (cercles) et DPPC (carrés). Pour DPPC, les résultats en simulation ont été repris de [16] et les résultats expérimentaux de [17]. La température des systèmes est de 298K pour la PC de saumon et 323K pour DPPC.

Il a été montré que les propriétés d'assemblage des lipides en bicouche  $L_{\alpha}$  peuvent être comparées à celles des monocouches lorsque ces dernières atteignent une pression de surface de 35 mN/m [205]. On retrouve cette spécificité dans le cas de la PC de saumon pour la monocouche où l'aire par lipide est de  $57 \text{ \AA}^2/\text{lipide}$  à  $\pi = 32,5 \text{ mN/m}$ . Or, cette aire correspond à celle occupée par un lipide dans la bicouche à 37 molécules d'eau par lipide avec le modèle d'eau SPCE.

D'un point de vue expérimental, l'isotherme de compression de la PC de saumon présente des surfaces moléculaires plus élevées que pour DPPC. Contrairement aux résultats expérimentaux obtenus dans cette étude avec la PC d'œuf et la PC de soja, ici on retrouve les caractéristiques observée par Dumauval et al. [17] où une augmentation de la teneur en SDPC dans la composition molaire de membranes DPPC résulte en un élargissement du plateau avant le collapse et un décalage vers des valeurs de surfaces moléculaires plus élevées pour les membranes les plus riches en SDPC.

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

Il a été montré dans les résultats expérimentaux qu'il peut être hasardeux de vouloir comparer des isothermes de compression provenant de différentes études puisque les résultats sont fortement dépendants des conditions expérimentales. Et les difficultés pour trouver dans la littérature des isothermes obtenus dans des conditions similaires a déjà été noté auparavant [223]. Il en va de même en simulation où les résultats vont dépendre du champ de force utilisé, de la valeur de  $\gamma_w$ , de la méthode de détermination de la pression de surface et du type même de simulation. Ici, l'isotherme de DPPC a été obtenu par simulation en gros grain avec le champ de force GROMACS. La valeur de  $\gamma_w$  utilisée est de 67,9 mN/m, valeur trouvée dans le CRC Handbook of Chemistry and Physics pour la tension de surface air/eau à 323K.

### VI. Discussion

Dans cette partie, le but était d'étudier à l'échelle moléculaire le comportement de la PC de saumon. Plusieurs approches ont été envisagées : tout d'abord, en comparant ses propriétés intrinsèques à celle de systèmes purs contenant en *sn-2* soit une insaturation (POPC) ou un acide gras polyinsaturé (PDPC). Dans un deuxième temps, l'influence du taux d'hydratation sur le système PC saumon a été étudiée afin de tenter de comprendre les mécanismes d'hydratation menant à des propriétés spécifiques découvertes avec les résultats expérimentaux (notamment la surface moléculaire constante malgré une augmentation de l'hydratation). Enfin, les systèmes PC saumon hydratés à différents taux ont été étudiés à 263K pour avoir une idée de la formation de la phase gel.

La première étape a consisté à vérifier les paramètres du champ de force et les conditions initiales du système PC saumon en confrontant les résultats expérimentaux obtenus avec la PC de saumon et les mêmes résultats obtenus en dynamique moléculaire. Les résultats ont montré qu'il était possible de reproduire avec précision certaines propriétés des bicouches de la PC de saumon, telles que l'évolution de la distance de répétition en fonction de l'hydratation des systèmes ainsi que l'évolution de l'aire par lipide. Bien que les valeurs de simulation soient légèrement supérieures aux valeurs expérimentales, on retrouve néanmoins la caractéristique de la PC de saumon à savoir une aire par lipide constante malgré l'augmentation de l'hydratation. Cependant, on dénote quelques faiblesses dans le champ de force notamment avec les systèmes purs où l'aire par lipide des systèmes POPC et PDPC est sous-estimée par rapport aux résultats expérimentaux. De plus, concernant ces deux systèmes, les résultats sur

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

les paramètres d'ordre pour les chaînes saturées en *sn-1* sont là surestimés par rapport aux valeurs expérimentales. Ce phénomène avait déjà été mis en évidence par Feller sur une simulation de DPPC où il constata également que la fraction gauche dans les chaînes aliphatiques était sous-estimée par rapport aux résultats expérimentaux [118].

Du fait de la composition hétéroclite de la PC de saumon avec un mélange de chaînes mono et polyinsaturées, son comportement diffère des systèmes purs tels que POPC et PDPC. Plusieurs propriétés ont été étudiées dans cette étude. De manière générale, les caractéristiques des chaînes acyles peuvent être catégorisées comme statiques ou dynamiques. Les propriétés dynamiques incluent les vitesses de transition des dièdres et les fonctions de corrélation dans le temps de l'orientation des différentes liaisons. En principe, ces fonctions de corrélation révèlent une quantité d'informations sur les mouvements dans les lipides [161]. Les propriétés statiques obtenues à partir des simulations sont les profils de densité, la conformation des chaînes carbonées via la détermination des paramètres d'ordre et la détermination des angles de torsion, et la capacité d'hydratation des têtes polaires. Dans notre cas, seules les propriétés statiques des chaînes ont été étudiées pour la PC de saumon et ces dernières ont été comparées à celles de POPC et PDPC.

La surface moléculaire de la PC de saumon se retrouve moyennée entre celle de POPC et celle de PDPC. Comme le système PC saumon est composé à 50% de POPC, il n'est pas surprenant de retrouver une valeur de l'aire par lipide moyenne. Les résultats des paramètres d'ordre montrent une augmentation du désordre observé dans les chaînes *sn-2* comparé au système POPC même si le comportement individuel de chaque chaîne d'acide gras diffère peu de celui des systèmes purs.

L'étude de l'influence du taux d'hydratation des membranes sur les propriétés structurales à montré que, lorsqu'ils en sont affectés, les paramètres ne sont influencés par l'hydratation que lorsque celui-ci est inférieur à 10 molécules d'eau par lipide. À 18 molécules d'eau par lipide, les propriétés sont les mêmes que lorsque le système est saturé en eau, c'est-à-dire à 37 molécules d'eau par lipide. Les résultats expérimentaux ont montré que pour la PC de saumon, l'hydratation des têtes polaires était maximum autours de 10 molécules d'eau par lipide et que ce résultat restait constant même en augmentant le ratio eau/lipide. Cette caractéristique est retrouvée ici avec la détermination de l'hydratation du groupement choline qui reste constante à ~15 molécules d'eau par lipide.

La diminution du taux d'hydratation en dessous de 10 molécules d'eau par lipide laisse à penser tout d'abord que le système PC saumon a entrepris une transition de phase lyotropique

### CHAPITRE III : Résultats et discussion

et se retrouve à l'état de gel, caractérisé par une diminution de l'aire par lipide et une augmentation de la distance hydrophobe (caractéristique d'une élongation des chaînes). Cependant, ces différents changements ne résultent pas d'un changement de conformation des chaînes acyles puisque la déshydratation n'affecte pas la répartition des angles dièdres ou le paramètre d'ordre des chaînes. On n'observe donc aucune transformation des chaînes en conformation *trans*, caractéristique de la phase gel. Il semble au contraire que la phase cristal de la PC de saumon obtenue par stress osmotique soit caractérisée par un certain désordre et maintienne une fluidité dans les chaînes acyles. Les effets de la déshydratation sont bien sûr visibles au niveau de l'hydratation des têtes polaires et diminuent progressivement la teneur en eau libre. Seules les molécules d'eau fortement associées à la tête polaire (celles liées par liaison hydrogène aux atomes d'oxygène libre) restent insensibles à la déshydratation. Lorsque le taux d'hydratation atteint 6 molécules d'eau par lipide, il n'y a plus de molécules d'eau non associées séparant les têtes polaires des bicouches opposées ce qui conduit à une interdigitation entre les têtes polaires des bicouches voisines.

L'étude de la PC de saumon à 263K donne des résultats similaires aux systèmes faiblement hydratés à 298K. En effet, les principaux effets observés lors de la diminution de température sont une réduction de la surface moléculaire et une augmentation de la distance de répétition due à une élongation de l'épaisseur des bicouches. Cependant, on observe également une légère augmentation dans l'ordre des chaînes caractérisé par une augmentation de la proportion de conformation *trans* pour les angles dièdres, que ce soit pour la chaîne saturée en *sn-1* ou les chaînes insaturées en *sn-2*. Ces effets s'observent quel que soit le taux d'hydratation des systèmes. En tenant compte des résultats expérimentaux, seuls les systèmes les moins hydratés ( $\alpha < 28$  molécules par lipide) devraient être en phase gel tandis que les plus hydratés se présenteraient en phase fluide. Or, les résultats de simulation ne permettent pas de conclure sur un effet de la déshydratation à cette température.

Il semble que malgré les quelques transformations structurales observées à 263K, les systèmes soient encore en phase fluide  $L_\alpha$  de type très ordonné. La transition de phase liquide cristal-gel en simulation est difficile à déterminer par simulation car la cinétique des processus de transformation est faible. Ainsi, il serait bon de poursuivre l'étude en prolongeant les temps de simulation, d'augmenter la taille des systèmes pour voir l'influence du taux d'hydratation sur la transition mais également l'influence de la composition mixte du système (et notamment la proximité des chaînes saturées et insaturées) sur la formation des noyaux gel et leur propagation dans la bicouche.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les objectifs de cette thèse étaient de définir les caractéristiques physico-chimiques d'une phosphatidylcholine (PC) d'origine naturelle enrichie en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) et de définir ses propriétés d'auto-assemblage en milieux aqueux. Notre choix de matériau de départ s'est porté sur les têtes de saumon puisque ce dernier fait partie de la classe des poissons dits gras et qu'il est une source réputée AGPI-LC tels que l'EPA et le DHA notamment dans les membranes cellulaires des cerveaux et des yeux. Parmi les différents phospholipides présents, la stratégie a été de ne retenir que la PC pour ne pas avoir un mélange trop hétérogène et parce qu'il existe une littérature abondante sur ce composé ce qui permet de faciliter la comparaison et l'explication de nos résultats.

La méthode d'extraction de l'huile des têtes de saumon qui a été élaborée dans des études précédentes au sein du laboratoire a permis de concentrer la fraction obtenue en lipides polaires. Dans ce travail, nous avons utilisé des outils adéquats et complémentaires pour la caractérisation du composé étudié. Ainsi, l'utilisation de méthodes chromatographiques a permis d'aboutir à la purification de la fraction PC à 85%, les 15% restants étant composés d'un mélange de phospholipides, et à l'obtention d'un profil détaillé de la composition en acide gras de cette fraction. Il apparaît que la fraction PC est composée de presque de moitié d'AGPI-LC, dans lesquels on retrouve 45% d'oméga 3 (30% de DHA et 11% d'EPA). La fraction PC est largement enrichie en EPA et DHA par rapport au mélange de lipides totaux obtenus directement après l'extraction de l'huile mais également par rapport à la fraction des lipides neutres. L'extraction et la purification de PC à partir d'huile de têtes de saumon semble donc constituer une source précieuse d'AGPI-LC en particulier en DHA. Ces phospholipides peuvent être considérés comme vecteurs potentiels d'AGPI-LC, sous forme de liposomes, afin d'atteindre les cellules neuronales pour des applications de prévention et/ou guérison de maladies neurodégénératives. Le but principal de cette étude était de déterminer les caractéristiques d'un tel composé en phase lamellaire.

La connaissance des propriétés structurales permet d'approfondir la compréhension des mécanismes d'interaction à l'échelle moléculaire existant à la fois entre les molécules lipidiques elles-mêmes mais également entre les lipides et les protéines, puisque ces interactions sont le reflet de la manière dont les lipides sont empaquetés au sein de la

## Conclusion

membrane cellulaire. Les propriétés structurales et dynamiques de la PC de saumon ont été déterminées et comparées avec des bicouches d'autres PC d'origine naturelle mais dépourvues d'AGPI-LC, telles que la PC d'œuf et la PC de soja. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le détail des propriétés structurales de la PC de saumon en phase cristalline ( $L_{\alpha}$ ). Ces résultats représentent une expansion naturelle aux études de bicouches composées de phospholipides à chaînes mixtes (saturées – polyinsaturées), dans lesquels l'influence des insaturations sur les propriétés a été explorée de façon systématique. Nous avons notamment étudié l'influence de l'hydratation des bicouches sur les paramètres structuraux tels que la distance de répétition des bicouches hydratées, l'aire par lipide, la distance hydrophobe et l'épaisseur de la membrane. Cependant, compte tenu des incertitudes liées au champ de force malgré les corrections qui lui sont apportées continuellement, et les restrictions découlant de l'échelle de temps (de l'ordre de la nanoseconde), il ne faut pas attendre des simulations d'obtenir des résultats de valeurs précises sur des quantités d'intérêt. Au lieu de cela, les résultats viennent confirmer les tendances décelées expérimentalement.

En procédant ainsi, nous avons pu mettre en évidence quelques aspects intéressants. L'évolution de lamellarité des bicouches en fonction de l'hydratation a notamment montré une particularité de la PC de saumon : la distance de répétition augmente fortement lorsque l'hydratation augmente laissant à penser que les molécules d'eau rajoutées viennent gonfler le film d'eau séparant les bicouches et ne participent pas à l'accroissement de l'aire par lipide. Les résultats expérimentaux obtenus par diffraction des rayons X sont confirmés par les résultats de simulation en dynamique moléculaire où, dans les deux cas, la surface moléculaire des lipides reste constante malgré l'augmentation de l'hydratation. L'étude de l'hydratation de la PC de saumon par méthode gravimétrique a montré l'influence des acides gras polyinsaturés à longues chaînes sur la capacité de la PC à adsorber des molécules d'eau par rapport à la PC d'œuf et la PC de soja. La modélisation des isothermes de sorption a indiqué que cette capacité se manifestait à la fois au niveau de la monocouche d'eau entourant les têtes polaires mais également au niveau de la quantité totale de molécules d'eau qui peuvent être adsorbées par phospholipide. Le mécanisme par lequel les acides gras polyinsaturés influent sur cette adsorption n'est pas résolu. En combinant les résultats gravimétriques avec ceux de simulation, on peut néanmoins proposer un modèle de structuration des molécules d'eau autour d'un phospholipide. Ce qu'on appelle monocouche d'eau serait représenté par les molécules fortement liées aux atomes d'oxygène du groupement phosphate par des liaisons hydrogène. Ces molécules d'eau seraient comprises

## Conclusion

entre 3 et 5 par lipide et formeraient une cage entourant la tête polaire. Les molécules d'eau de la couche suivante ne sont plus fortement liées à la tête polaire, celles-ci seraient orientées vers la surface de la bicouche. Les paramètres structuraux de la PC de saumon déterminés à partir de la diffraction des rayons X en fonction du taux d'hydratation des bicouches indique que la tête polaire devient saturée en eau à partir de 10 molécules par lipide. L'étude du positionnement des molécules d'eau autour des têtes polaires déterminée par simulation indique une monocouche de 15 molécules d'eau entourant chaque groupement choline et ce, quel que soit également le taux d'hydratation. On en déduit que la deuxième couche d'eau se compose de 10 à 15 molécules d'eau par lipide. Enfin la dernière couche d'eau est appelée eau libre. Elle correspond au nombre de molécules d'eau capables d'être associées à un phospholipide en multicouches avant que le système ne subisse un déphasage. D'après les résultats gravimétriques et les distances de répétition des bicouches de PC de saumon comparé aux bicouches de PC d'œuf et de soja, c'est sur la première et dernière couche d'eau que l'influence des acides gras polyinsaturés à longues chaînes se ferait sentir. Or, l'interaction des molécules d'eau avec les phospholipides constitue un intérêt majeur puisque de nombreux processus biologiques ont lieu au niveau de l'interface des cellules, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur. La dynamique moléculaire a montré que les bicouches de PC saumon présentent une fluidité plus importante qu'une bicouche composée uniquement de lipides monoinsaturés, caractérisée par un désordre des chaînes latérales accru et par la présence de nombreux « défauts » dans la conformation globale des chaînes.

Par rapport à d'autres systèmes de bicouches composées de lipides purs ou d'un mélange de lipides qui présentent une augmentation de l'aire par lipide lorsque les conditions de solvation des bicouches augmentent, les résultats actuels n'ont pas permis d'expliquer pourquoi les bicouches de la PC de saumon présentent une aire par lipide constante quel que soit leur taux d'hydratation. Les bicouches présentent également une surface moléculaire plus faible contrairement à ce qui pourrait être attendu. Ces deux points n'ont pas trouvé de réponse et nécessitent une investigation approfondie.

Dans la continuité de l'étude des propriétés fondamentales de la PC de saumon, il serait intéressant d'étudier la dynamique des bicouches, à la fois par des mesures expérimentales comme l'étude de la fusion de liposomes de PC de saumon puis la diffusion de ces liposomes au sein de membranes biologiques par le biais de microscopie de fluorescence mais également par les mesures des temps de corrélation, temps moyens correspondants aux différents

## Conclusion

mouvements des lipides. Ces temps peuvent être déterminés par résonance magnétique nucléaire mais également par dynamique moléculaire.

Il a été montré que l'influence sur la santé des acides gras polyinsaturés pouvait résulter de trois mécanismes d'action fondamentaux : la modification des propriétés biophysiques des membranes, l'interaction spécifique entre les lipides insaturés et les protéines membranaires et la synthèse de molécules à partir des acides gras comme signaux de transduction. Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressés au premier mécanisme en évaluant certaines propriétés de multicouches enrichies en acides gras polyinsaturés à longues chaînes. Il serait intéressant d'étudier les deux autres points en utilisant la PC de saumon comme modèle de membrane insaturée. Du fait de la présence en grandes quantités des acides gras polyinsaturés, la PC de saumon présente un risque important vis-à-vis de l'oxydation. C'est un point qui n'a pas été abordé dans cette étude mais qui mérite une attention particulière notamment dans le but de garantir une stabilité maximale des liposomes s'ils doivent être utilisés à des fins thérapeutiques.

D'un point de vue application, il serait intéressant d'étudier les propriétés fonctionnelles des différentes entités structurales formées, c'est-à-dire des liposomes de PC de saumon en vue de leur utilisation dans différentes applications nutritionnelles. En effet, les oméga 3 ayant été associés dans la prévention de nombreuses pathologies, la vectorisation de ces acides gras par l'élaboration de vésicules reste un moyen très efficace pour compléter l'apport actuel trop faible dans notre alimentation.

## Références

1. M.C. Erickson, Lipid oxidation of Muscle Foods, in: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, D.B.M. Casimir C. Akoh, Ed., Taylor & Francis: (New York) 2004.
2. M.C. Erickson, Chemistry and Function of Phospholipides, in: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology - 2nd edition*, D.B.M. Casimir C. Akoh, Ed., Marcel Dekker: (New York) 2004.
3. R.B. Gennis, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer Advanced Texts in Chemistry, ed. C.R. Cantor. (New-York)1989 Springer-Verlag
4. H. Binder and K. Gawrisch: Effect of unsaturated lipid chains on dimensions, molecular order and hydration of membranes. *J. Phys. Chem. B*. 2001. **105**, 12378-12390.
5. K.R. Applegate and J.A. Glomset: Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res*. 1986. **27**, 658-680.
6. S.E. Feller, K. Gawrisch, and A.D. MacKerell Jr: Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: Intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J. Am. Chem. Soc.* 2002. **124**, 318-326.
7. C.D. Niebylski and N. Salem Jr: A calorimetric investigation of a series of mixed-chain polyunsaturated phosphatidylcholines: Effect of sn-2 chain length and degree of unsaturation. *Biophys. J.* 1994. **67**, 2387-2393.
8. H. Bunjes and T. Unruh: Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 2007. **59**, 379-402.
9. C. Chipot, La Dynamique Moléculaire. Observer la matière en mouvement, in: *Les nanosciences. 3. Nanotechnologies et nanobiologie*, M. Lahmani, Boisseau, P., Houdy, P., Ed: (Paris) 2007, pp. 791-826.
10. D.M. Small: Phase equilibria and structure of dry and hydrated egg lecithin. *J. Lipid Res*. 1967. **8**, 551-557.
11. B. Bergenstahl and K. Fontell: Phase equilibria in the system soybean lecithin/water. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 1983. **68**, 48-52.
12. T. Huber, K. Rajamoorthi, V.F. Kurze, K. Beyer, and M.F. Brown: Structure of docosahexaenoic acid-containing phospholipid bilayers as studied by  $^2\text{H}$  NMR and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 2002. **124**, 298-309.
13. A. Seelig and J. Seelig: Effect of a single cis double bond on the structure of a phospholipid bilayer. *Biochemistry*. 1977. **16**, 45-50.
14. J. Seelig: Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipid bilayerst. *Biochemistry*. 1978. **17**, 3310-3315.
15. B. Perly, I.C.P. Smith, and H.C. Jarrell: Effects of the replacement of a double bond by a cyclopropane ring in phosphatidylethanolamines: A  $^2\text{H}$  NMR study of phase transitions and molecular organization. *Biochemistry*. 1985. **24**, 1055-1063.
16. S.L. Duncan and R.G. Larson: Comparing experimental and simulated pressure-area isotherms for DPPC. *Biophys. J.* 2008. **94**, 2965-2986.
17. A.C. Dumauual, L.J. Jencki, and W. Stillwell: Liquid crystalline/gel state phase separation in docosahexaenoic acid-containing bilayers and monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. **1463**, 395-406.
18. V. Luzzati, *Biological Membranes (3rd edition)*, ed. D. Chapman. (New-York)1968 Academic Press

19. S.F. O'Keefe, Nomenclature and Classification of Lipids, in: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology - 2nd edition*, C.C.A.D.B. Min, Ed., Marcel Dekker: (New York) 2004.
20. F.D. Gunstone, Harwood, J.L., Padley, F.B., *The Lipid Handbook, Second Edition*, ed. C.a. Hall. (London)1994
21. F. Sahena, I.S.M. Zaidul, S. Jinap, N. Saari, H.A. Jahurul, K.A. Abbas, and N.A. Norulaini: PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2009. **8**, 59-74.
22. K. Larsson, *Lipids: Molecular Organization, Physical Functions and Technical Applications*. Oily Press Lipid Library. (Glasgow)1994
23. V. Dubois, S. Breton, M. Linder, J. Fanni, and M. Parmentier: Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2007. **109**, 710-732.
24. B. Davis, Maximizing essential fatty acid status in vegetarians, in: *Nutrition and Health - Current Topics*, T.C.K. Descheemaeker, Ed., Garent: (Antwerp) 2005.
25. A.P. Simopoulos: Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr*. 1991. **54**, 438-463.
26. K.W. Cho, J. Shin, and K. Jung: Lipid and fatty acid composition of the Antarctic krill *Euphausia superba*. *Ocean Research*. 1999. **21**, 109-116.
27. M.K. Al-Sayed, M. Linder, J. Fanni, and M. Parmentier: Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe. *Process Biochem*. 2008. **43**, 376-383.
28. M. Pirini, S. Testi, V. Ventrella, A. Pagliarani, and A. Badiani: Blue-back fish: Fatty acid profile in selected seasons and retention upon baking. *Food Chem*. 2010. **123**, 306-314.
29. A.P. Simopoulos: The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: Health implications. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*. 2010. **17**, 267-275.
30. B. Hennig, M. Toborek, A.A. Cader, and E.A. Decker: Nutrition, endothelial cell metabolism, and atherosclerosis. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr*. 1994. **34**, 253-282.
31. A. Leaf, J.X. Kang, Y.F. Xiao, and G.E. Billman: Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation*. 2003. **107**, 2646-2652.
32. F. Lombardi and P. Terranova: Anti-arrhythmic properties of N-3 poly-unsaturated fatty acids (n-3 PUFA). *Curr. Med. Chem*. 2007. **14**, 2070-2080.
33. I.A. Brouwer, A. Geelen, and M.B. Katan: n-3 Fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. *Prog. Lipid Res*. 2006. **45**, 357-367.
34. U.N. Wanasundara, Wanasundara, J. P. D., gamma-Linolenic Acid: Purification and Functionality, in: *Handbook of Functional Lipids*, C.C. Akoh, Ed., Taylor & Francis: (New York) 2006.
35. U.N. Das: Gamma-linolenic acid, arachidonic acid, and eicosapentaenoic acid as potential anticancer drugs. *Nutrition*. 1990. **6**, 429-434.
36. S.L. Goodstine, T. Zheng, T.R. Holford, B.A. Ward, D. Carter, P.H. Owens, and S.T. Mayne: Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: Possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. *J. Nutr*. 2003. **133**, 1409-1414.
37. A.C.M. Thiébaud, V. Chajès, M. Gerber, M.C. Boutron-Ruault, V. Joulin, G. Lenoir, F. Berrino, E. Riboli, J. Béniehou, and F. Clavel-Chapelon: Dietary intakes of  $\omega$ -6 and w-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int. J. Cancer*. 2009. **124**, 924-931.
38. L.M. Braden and K.K. Carroll: Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids*. 1986. **21**, 285-288.

39. R.S. Chapkin, J. Seo, D.N. McMurray, and J.R. Lupton: Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chem. Phys. Lipids*. 2008. **153**, 14-23.
40. P. Astorg: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: A review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Causes and Control*. 2004. **15**, 367-386.
41. R.M. Van Dam, W.C. Willett, E.B. Rimm, M.J. Stampfer, and F.B. Hu: Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*. 2002. **25**, 417-424.
42. J.A. Nettleton and R. Katz: n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review. *Journal of the American Dietetic Association*. 2005. **105**, 428-440.
43. J. Delarue, C. LeFoll, C. Corporeau, and D. Lucas: n-3 long chain polyunsaturated fatty acids: A nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod. Nutr. Dev.* 2004. **44**, 289-299.
44. A.P. Simopoulos: The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002. **56**, 365-379.
45. P.C. Calder: Polyunsaturated fatty acids and inflammation: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis. *Current Rheumatology Reviews*. 2009. **5**, 214-225.
46. R.G. Ackman, Marine Lipids and Omega-3 Fatty Acids, in: *Handbook of Functional Lipids*, C.C. Akoh, Ed., CRC Press 2006.
47. S. Mazzari, Zanotti, A., Orlando, P., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of phosphatidylserine liposomes in mice, in: *Transport in biomembranes. Model systems and reconstitution.*, R. Antolini, Giozzi, A., Gorio, A., Ed., Raven Press: (New-York) 1982, pp. 257-263.
48. F. Thies, C. Pillon, P. Moliere, M. Lagarde, and J. Lecerf: Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1994. **267**, 1273-1279.
49. A.M. Lyberg, E. Fasoli, and P. Adlercreutz: Monitoring the oxidation of docosahexaenoic acid in lipids. *Lipids*. 2005. **40**, 969-979.
50. M. Cansell, F. Nacka, and N. Combe: Marine lipid-based liposomes increase in vivo FA bioavailability. *Lipids*. 2003. **38**, 551-559.
51. F. Nacka, M. Cansell, and B. Entressangles: In vitro behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts, and phospholipase A2. *Lipids*. 2001. **36**, 35-42.
52. L. Lauritzen, H.S. Hansen, M.H. Jorgensen, and K.F. Michaelsen: The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.* 2001. **40**, 1-94.
53. M.V. Bell, J.R. Dick, and C. Buda: Molecular speciation of fish sperm phospholipids: Large amounts of dipolyunsaturated phosphatidylserine. *Lipids*. 1997. **32**, 1085-1091.
54. N. Salem, Kim, H.-Y., Yergey, J.A., Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism, in: *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*, A.P. Simopolous, Kifer, R.R., Martin, R.E., Ed., Academic Press: (New-York) 1986, pp. 319-351.
55. R.E. Anderson and L. Sperling: Lipids of ocular tissues. VII. Positional distribution of the fatty acids in the phospholipids of bovine retina rod outer segments. *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. **144**, 673-677.
56. W. Stillwell and S.R. Wassall: Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids*. 2003. **126**, 1-27.
57. L. Svennerholm: Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J. Lipid Res.* 1968. **9**, 570-579.

58. F. Calderon and H.Y. Kim: Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 2004. **90**, 979-988.
59. A. Ahmad, T. Moriguchi, and N. Salem Jr: Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatric Neurology.* 2002. **26**, 210-218.
60. M. Haag: Essential fatty acids and the brain. *Canadian Journal of Psychiatry.* 2003. **48**, 195-203.
61. J.F. Quinn, R. Raman, R.G. Thomas, K. Yurko-Mauro, E.B. Nelson, C. Van Dyck, J.E. Galvin, J. Emond, C.R. Jack Jr, M. Weiner, L. Shinto, and P.S. Aisen: Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: A randomized trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2010. **304**, 1903-1911.
62. S.C. Cunnane, M. Plourde, F. Pifferi, M. Bégin, C. Féart, and P. Barberger-Gateau: Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog. Lipid Res.* 2009. **48**, 239-256.
63. C. Boudrault, R.P. Bazinet, and D.W.L. Ma: Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 2009. **20**, 1-10.
64. F. Calon, G.P. Lim, F. Yang, T. Morihara, B. Teter, O. Ubeda, P. Rostaing, A. Triller, N. Salem Jr, K.H. Ashe, S.A. Frautschy, and G.M. Cole: Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron.* 2004. **43**, 633-645.
65. D. Weitz, H. Weintraub, E. Fisher, and A.Z. Schwartzbard: Fish oil for the treatment of cardiovascular disease. *Cardiology in Review.* 2010. **18**, 258-263.
66. P.M. Kris-Etherton, W.S. Harris, and L.J. Appel: Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002. **106**, 2747-2757.
67. C.J. Lavie, R.V. Milani, M.R. Mehra, and H.O. Ventura: Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009. **54**, 585-594.
68. A. Mendes, A. Reis, R. Vasconcelos, P. Guerra, and T. Lopes Da Silva: *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: A review. *J. Appl. Phycol.* 2009. **21**, 199-214.
69. S.E. Feller and K. Gawrisch: Properties of docosahexaenoic-acid-containing lipids and their influence on the function of rhodopsin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005. **15**, 416-422.
70. M.J. Bruno, R.E. Koeppe II, and O.S. Andersen: Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. **104**, 9638-9643.
71. O. Monroig, J.C. Navarro, F. Amat, P. Gonzalez, and F. Hontoria: Oxidative stability and changes in the particle size of liposomes used in the *Artemia* enrichment. *Aquaculture.* 2007. **266**, 200-210.
72. J.P. Cosgrove, D.F. Church, and W.A. Pryor: The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 1987. **22**, 299-304.
73. M.Y. Baik, E.L. Suhendro, W.W. Nawar, D.J. McClements, E.A. Decker, and P. Chinachoti: Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2004. **81**, 355-360.
74. N. Belhaj, E. Arab-Tehrany, and M. Linder: Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochem.* 2010. **45**, 187-195.
75. J.H. Lee, David B. Min, Nutraceuticals, Aging, and Food Oxidation, in: *Handbook of Functional Lipids*, C.C. Akoh, Ed., Taylor & Francis: (New York) 2006.

76. D.A. White, The phospholipid composition in mammalian tissues, in: *Form and Functions of Phospholipids*, G.B. Ansell, Dawson, R. M. C., Hawthorne, J. N., Ed., Elsevier: (Amsterdam) 1973, pp. 441-482.
77. M.E. Muriel, M.T. Antequera, M.J. Petron, A.I. Andres, and J. Ruiz: Stereospecific analysis of fresh and dry-cured muscle phospholipids from Iberian pigs. *Food Chem.* 2005. **90**, 437-443.
78. M. Linder and R.G. Ackman: Volatile compounds recovered by solid-phase microextraction from fresh adductor muscle and total lipids of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) from georges bank (Nova Scotia). *J. Food Sci.* 2002. **67**, 2032-2037.
79. D. Li, Y. Zhang, and A.J. Sinclair: Seasonal variations of lipid content and composition in *Perna viridis*. *Lipids.* 2007. **42**, 739-747.
80. P.R. Cullis, Hope, M.J., Physical properties and functional roles of lipids in membranes, in: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, D.E.V. Vance, J.E., Ed., Elsevier 1991, pp. 1-43.
81. R. Koynova and M. Caffrey: Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. **1376**, 91-145.
82. R. Prasad, *Manual on Membrane Lipids*, ed. R. Prasad. (New-York)1996 Springer-Verlag
83. L. Amate, M. Ramirez, and A. Gil: Positional analysis of triglycerides and phospholipids rich in long-chain polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 1999. **34**, 865-871.
84. E.M. Bevers and P.L. Williamson: Phospholipid scramblase: An update. *FEBS Lett.* 2010. **584**, 2724-2730.
85. A. Simonsen, A.E. Wurmser, S.D. Emr, and H. Stenmark: The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001. **13**, 485-492.
86. D.E. Vance, Vance, J., *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, ed. D.E. Vance, Vance, J. (Amsterdam)1996 Elsevier
87. D. Lemaitre-Delaunay, C. Pachiaudi, M. Laville, J. Pousin, M. Armstrong, and M. Lagarde: Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [<sup>13</sup>C]DHA in phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* 1999. **40**, 1867-1874.
88. M. Lagarde, N. Bernoud, N. Brossard, D. Lemaitre-Delaunay, F. ThiÃ's, M. Croset, and J. Lecerf: Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. *J. Mol. Neurosci.* 2001. **16**, 201-204.
89. A. Lykidis: Comparative genomics and evolution of eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 2007. **46**, 171-199.
90. F.W. Kullenberg, Lecithin in animal and health nutrition, in: *Lecithins: Sources, Manufacture and Uses*, B.F. Szuhaj, Ed., AOCS: (Champaign) 1989.
91. M. Schneider: Phospholipids for functional food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2001. **103**, 98-101.
92. A. Tardieu, V. Luzzati, and F.C. Reman: Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: A study of lecithin-water phases. *J. Mol. Biol.* 1973. **75**, 711-718, IN17-IN19, 179-733.
93. R. Koynova and M. Caffrey: An index of lipid phase diagrams. *Chem. Phys. Lipids.* 2002. **115**, 107-219.
94. G.V. Betageri, S.A. Jenkins, and D.L. Parsons, *Liposome drug delivery systems*1993 Technomic Pub.
95. Z. Drulis-Kawa and A. Dorotkiewicz-Jach: Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int. J. Pharm.* 2010. **387**, 187-198.

96. G. Gregoriadis: Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems. *Trends Biotechnol.* 1995. **13**, 527-537.
97. N. Kucerka, M.P. Nieh, J. Pencer, T. Harroun, and J. Katsaras: The study of liposomes, lamellae and membranes using neutrons and X-rays. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2007. **12**, 17-22.
98. A. Diller, C. Loudet, F. Aussenac, G. Raffard, S. Fournier, M. Laguerre, A. GrÅ©lard, S.J. Opella, F.M. Marassi, and E.J. Dufourc: Bicelles: A natural 'molecular goniometer' for structural, dynamical and topological studies of molecules in membranes. *Biochimie.* 2009. **91**, 744-751.
99. R. Gorjao, A.K. Azevedo-Martins, H.G. Rodrigues, F. Abdulkader, M. Arcisio-Miranda, J. Procopio, and R. Curi: Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacology and Therapeutics.* 2009. **122**, 56-64.
100. S.E. Feller, D. Yin, R.W. Pastor, and A.D. MacKerell Jr: Molecular dynamics simulation of unsaturated lipid bilayers at low hydration: Parameterization and comparison with diffraction studies. *Biophys. J.* 1997. **73**, 2269-2279.
101. B.W. Koenig, H.H. Strey, and K. Gawrisch: Membrane lateral compressibility determined by NMR and X-ray diffraction: Effect of acyl chain polyunsaturation. *Biophys. J.* 1997. **73**, 1954-1966.
102. S. Tristram-Nagle, H.I. Petrache, and J.F. Nagle: Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* 1998. **75**, 917-925.
103. J.F. Nagle and S. Tristram-Nagle: Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes.* 2000. **1469**, 159-195.
104. R.J. Pace and S.I. Chan: Molecular motions in lipid bilayers. I. Statistical mechanical model of acyl chain motion. *The Journal of Chemical Physics.* 1982. **76**, 4217-4227.
105. G. BÅ¼ldt, H.U. Gally, J. Seelig, and G. Zaccai: Neutron diffraction studies on phosphatidylcholine model membranes. I. Head group conformation. *J. Mol. Biol.* 1979. **134**, 673-691.
106. P. Balgavy, M. Dubnickova, D. Uhrikova, S. Yaradaikin, M. Kiselev, and V. Gordeliy: Bilayer thickness in unilamellar extruded egg yolk phosphatidylcholine liposomes: A small-angle neutron scattering study. *Acta Physica Slovaca.* 1998. **48**, 509-533.
107. H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, and J.F. Nagle: Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers. *Chem. Phys. Lipids.* 1998. **95**, 83-94.
108. S.H. White and G.I. King: Molecular packing and area compressibility of lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985. **82**, 6532-6536.
109. H.L. Brockman, K.R. Applegate, M.M. Momsen, W.C. King, and J.A. Glomset: Packing and electrostatic behavior of sn-2-docosahexaenoyl and -arachidonoyl phosphoglycerides. *Biophys. J.* 2003. **85**, 2384-2396.
110. M. Zerouga, L.J. Janski, and W. Stillwell: Comparison of phosphatidylcholines containing one or two docosahexaenoic acyl chains on properties of phospholipid monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. **1236**, 266-272.
111. H.I. Petrache, A. Salmon, and M.F. Brown: Structural properties of docosahexaenoyl phospholipid bilayers investigated by solid-state <sup>2</sup>H NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2001. **123**, 12611-12622.
112. S. Ollila, M.T. HyvÅ¶nen, and I. Vattulainen: Polyunsaturation in lipid membranes: Dynamic properties and lateral pressure profiles. *J. Phys. Chem. B.* 2007. **111**, 3139-3150.
113. L.L. Holte, S.A. Peter, T.M. Sinnwell, and K. Gawrisch: <sup>2</sup>H nuclear magnetic resonance order parameter profiles suggest a change of molecular shape for

- phosphatidylcholines containing a polyunsaturated acyl chain. *Biophys. J.* 1995. **68**, 2396-2403.
114. A. Salmon, S.W. Dodd, G.D. Williams, J.M. Beach, and M.F. Brown: Configurational statistics of acyl chains in polyunsaturated lipid bilayers from  $^2\text{H}$  NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 1987. **109**, 2600-2609.
  115. K. Rajamoorthi, H.I. Petrache, T.J. McIntosh, and M.F. Brown: Packing and viscoelasticity of polyunsaturated *w*-3 and *w*-6 lipid bilayers as seen by  $^2\text{H}$  NMR and X-ray diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. **127**, 1576-1588.
  116. L. Saiz and M.L. Klein: Structural properties of a highly polyunsaturated lipid bilayer from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* 2001. **81**, 204-216.
  117. K. Gawrisch, N.V. Eldho, and L.L. Holte: The structure of DHA in phospholipid membranes. *Lipids*. 2003. **38**, 445-452.
  118. S.E. Feller: Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids. *Chem. Phys. Lipids*. 2008. **153**, 76-80.
  119. A. Chabanel, M. Flamm, and K.L.P. Sung: Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys. J.* 1983. **44**, 171-176.
  120. W. Rawicz, K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans: Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* 2000. **79**, 328-339.
  121. H. Binder and K. Gawrisch: Dehydration induces lateral expansion of polyunsaturated 18:0-22:6 phosphatidylcholine in a new lamellar phase. *Biophys. J.* 2001. **81**, 969-982.
  122. C.H. Huang: Mixed-chain phospholipids: Structures and chain-melting behavior. *Lipids*. 2001. **36**, 1077-1097.
  123. M.A. Hink, A. Van Hoek, and A.J.W.G. Visser: Dynamics of Phospholipid Molecules in Micelles: Characterization with Fluorescence Correlation Spectroscopy and Time-Resolved Fluorescence Anisotropy. *Langmuir*. 1999. **15**, 992-997.
  124. N. Salem Jr, P. Serpentino, J.S. Puskin, and L.G. Abood: Preparation and spectroscopic characterization of molecular species of brain phosphatidylserines. *Chem. Phys. Lipids*. 1980. **27**, 289-304.
  125. C.D. Stubbs, T. Kouyama, K. Kinoshita Jr, and A. Ikegami: Effect of double bonds on the dynamic properties of the hydrocarbon region of lecithin bilayers. *Biochemistry*. 1981. **20**, 4257-4262.
  126. S.J. Singer and G.L. Nicolson: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972. **175**, 720-731.
  127. S.J. Singer and G.L. Nicolson: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972. **175**, 720-731.
  128. D.M. Engelman: Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*. 2005. **438**, 578-580.
  129. K. Simons and E. Ikonen: Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997. **387**, 569-572.
  130. R.E. Brown: Sphingolipid organization in biomembranes: What physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* 1998. **111**, 1-9.
  131. D.A. Brown and E. London: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000. **275**, 17221-17224.
  132. D.A. Brown and E. London: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000. **275**, 17221-17224.
  133. R.E. Brown: Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* 1998. **111**.
  134. K. Simons and E. Ikonen: Functional rafts in cell membranes. . 387. 1997. **Nature**, 569-572.
  135. M. Edidin, *The state of lipid rafts: From model membranes to cells*, in *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003. p. 257-283.

136. L.J. Pike: Lipid rafts: Heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 2004. **378**, 281-292.
137. J. Folch, M. Lees, and G.H. Sloane Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957. **226**, 497-509.
138. E.G. Bligh and W.J. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. **37**, 911-917.
139. D. Joebstl, D. Bandoniene, T. Meisel, and S. Chatzistathis: Identification of the geographical origin of pumpkin seed oil by the use of rare earth elements and discriminant analysis. *Food Chem.* 2010. **123**, 1303-1309.
140. R.A. Moreau, M.J. Powell, and V. Singh: Pressurized Liquid Extraction of Polar and Nonpolar Lipids in Corn and Oats with Hexane, Methylene Chloride, Isopropanol, and Ethanol. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2003. **80**, 1063-1067.
141. J.W. King: Supercritical fluid extraction: Present status and prospects. *Grasas Aceites.* 2002. **53**, 8-21.
142. V. Vandana, M.S.L. Karuna, P. Vijayalakshmi, and R.B.N. Prasad: A simple method to enrich phospholipid content in commercial soybean lecithin[2]. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2001. **78**, 555-556.
143. M.T. Combs, M. Ashraf-Khorassani, and L.T. Taylor: Packed column supercritical fluid chromatography-mass spectroscopy: A review. *J. Chromatogr. A.* 1997. **785**, 85-100.
144. J. Hirsch and E.H. Ahrens Jr: The separation of complex lipide mixtures by the use of silicic acid chromatography. *The Journal of biological chemistry.* 1958. **233**.
145. V. Ruiz-Gutiérrez and M.C. Pérez-Camino: Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr. A.* 2000. **885**, 321-341.
146. J.G. Parsons and S. Patton: Two-dimensional thin-layer chromatography of polar lipids from milk and mammary tissue. *J. Lipid Res.* 1967. **8**, 696-698.
147. W.W. Christie: Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. *J. Lipid Res.* 1985. **26**, 507-512.
148. C. Beermann, A. Green, M. Möbius, J.J. Schmitt, and G. Boehm: Lipid class separation by HPLC combined with GC FA analysis: Comparison of seed lipid compositions from different Brassica napus L. Varieties. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2003. **80**, 747-753.
149. W.W. Christie, Analysis of phospholipids and glycosyldiacylglycerols, in: *Lipid analysis*, W.W. Christie, Ed., The Oily Press: (Scotland) 2003, pp. 138-139.
150. H.S.H. Yip, M. Ashraf-Khorassani, and L.T. Taylor: Feasibility of phospholipids separation by packed column SFC with mass spectrometric and light scattering detection. *Chromatographia.* 2007. **65**, 655-665.
151. D.L. Vaden, V.M. Gohil, Z. Gu, and M.L. Greenberg: Separation of yeast phospholipids using one-dimensional thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* 2005. **338**, 162-164.
152. J.S. Ellingson and R.L. Zimmerman: Rapid separation of gram quantities of phospholipids from biological membranes by preparative high performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 1987. **28**, 1016-1018.
153. N. Kucerka, Y. Liu, N. Chu, H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, and J.F. Nagle: Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using x-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 2005. **88**, 2626-2637.

154. D.E. Gragson, D. Beaman, and R. Porter: Using compression isotherms of phospholipid monolayers to explore critical phenomena. A biophysical chemistry experiment. *J. Chem. Educ.* 2008. **85**, 272-275.
155. G.L. Jendrasiak: The hydration of phospholipids and its biological significance. *J. Nutr. Biochem.* 1996. **7**, 599-609.
156. S. Uran, A. Larsen, P.B. Jacobsen, and T. Skotland: Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2001. **758**, 265-275.
157. F. Michaux, J.L. Blin, and M.J. Stébé: Design of ordered bimodal mesoporous silica materials by using a mixed fluorinated-hydrogenated surfactant-based system. *Langmuir.* 2007. **23**, 2138-2144.
158. M. Mohamad Saad, C. Gaiani, J. Scher, B. Cuq, J.J. Ehrhardt, and S. Desobry: Impact of re-grinding on hydration properties and surface composition of wheat flour. *J. Cereal Sci.* 2009. **49**, 134-140.
159. M.P. Allen and D.J. Tildesley, *Computer simulation of liquids* 1989 Clarendon Press
160. D. Frenkel, Smit, B., *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*, ed. D. Frenkel, Klein, M., Parrinello, M., Smit, B. 2002 Elsevier
161. D.P. Tieleman, S.J. Marrink, and H.J.C. Berendsen: A computer perspective of membranes: Molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes.* 1997. **1331**, 235-270.
162. H.J.C. Berendsen, Tielman, D.P., Molecular dynamics studies of lipid bilayers, in: *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, P. Kollman, Ed., Wiley: (New York) 1997.
163. A.D. MacKerell Jr, D. Bashford, M. Bellott, R.L. Dunbrack Jr, J.D. Evanseck, M.J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F.T.K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D.T. Nguyen, B. Prodhom, W.E. Reiher Iii, B. Roux, M. Schlenkrich, J.C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wierkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus: All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B.* 1998. **102**, 3586-3616.
164. S.E. Feller and A.D. MacKerell Jr: An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J. Phys. Chem. B.* 2000. **104**, 7510-7515.
165. P.P. Ewald: Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.* 1921. **64**, 253-287.
166. U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L.G. Pedersen: A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 1995. **103**, 8577-8593.
167. C. Chipot, Klein, M. L., Tarek, M., Modeling Lipid Membranes, in: *Handbook of Materials Modeling*, S. Yip, Ed., Springer: (Netherlands) 2005, pp. 929-958.
168. H.I. Petrache, K. Tu, and J.F. Nagle: Analysis of simulated NMR order parameters for lipid bilayer structure determination. *Biophys. J.* 1999. **76**, 2479-2487.
169. S. Everts and J.H. Davis: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of multilamellar dispersions of polyunsaturated (22:6) phospholipids. *Biophys. J.* 2000. **79**, 885-897.
170. R.P. Rand and V.A. Parsegian: Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes.* 1989. **988**, 351-376.
171. R.G. Snyder, K. Tu, M.L. Klein, R. Mendelssohn, H.L. Strauss, and W. Sun: Acyl chain conformation and packing in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers from MD simulation and IR spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* 2002. **106**, 6273-6288.
172. M. Trapp, T. Gutberlet, F. Juranyi, T. Unruh, B. Demé, M. Tehei, and J. Peters: Hydration dependent studies of highly aligned multilayer lipid membranes by neutron scattering. *J. Chem. Phys.* 2010. **133**.

173. L. Martinez, R. Andrade, E.G. Birgin, and J.M. Martinez: PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 2009. **30**, 2157-2164.
174. L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, and K. Schulten: NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. *J. Comput. Phys.* 1999. **151**, 283-312.
175. G.A. Gbogouri, *Co-valorisation des protéines et des lipides riches en lécithine et en acides gras polyinsaturés omega 3 à partir de têtes de saumon par hydrolyse enzymatique*, in *Laboratoire de Science et Génie Alimentaire*. 2005, INPL - ENSAIA: Nancy.
176. G.A. Gbogouri, M. Linder, J. Fanni, and M. Parmentier: Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006. **108**, 766-775.
177. K.D. Thompson, R.J. Henderson, and M.F. Tatner: A comparison of the lipid composition of peripheral blood cells and head kidney leucocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 1995. **112**, 83-92.
178. M. Aursand, F. Mabon, and G.J. Martin: Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000. **77**, 659-666.
179. J.R. Henderson, J.G. Bell, and M.T. Park: Polyunsaturated fatty acid composition of the salmon (*Salmo salar* L.) pineal organ: Modification by diet and effect on prostaglandin production. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. 1996. **1299**, 289-298.
180. I.S. Stoknes, H.M.W. Okland, E. Falch, and M. Synnes: Fatty acid and lipid class composition in eyes and brain from teleosts and elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2004. **138**, 183-191.
181. M.T. Arts, H.I. Browman, I.E. Jokinen, and A.B. Skiftesvik: Effects of UV radiation and diet on polyunsaturated fatty acids in the skin, ocular tissue and dorsal muscle of Atlantic salmon (*Salmo Salar*) held in outdoor rearing tanks. *Photochem. Photobiol.* 2010. **86**, 909-919.
182. J.G. Bell, J. Pratoomyot, F. Strachan, R.J. Henderson, R. Fontanillas, A. Hebard, D.R. Guy, D. Hunter, and D.R. Tocher: Growth, flesh adiposity and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) families with contrasting flesh adiposity: Effects of replacement of dietary fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*. 2010. **306**, 225-232.
183. E. Falch, T.R. Storseth, and M. Aursand: Multi-component analysis of marine lipids in fish gonads with emphasis on phospholipids using high resolution NMR spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*. 2006. **144**, 4-16.
184. J. Peng, Y. Larondelle, D. Pham, R.G. Ackman, and X. Rollin: Polyunsaturated fatty acid profiles of whole body phospholipids and triacylglycerols in anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2003. **134**, 335-348.
185. J.G. Bell, A.H. McVicar, M.T. Park, and J.R. Sargent: High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Association with stress susceptibility and cardiac lesion. *J. Nutr.* 1991. **121**, 1163-1172.
186. P.J. Quinn and C. Wolf: Hydrocarbon chains dominate coupling and phase coexistence in bilayers of natural phosphatidylcholines and sphingomyelins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009. **1788**, 1126-1137.

187. F. Candau, F. Ballet, F. Debeauvais, and J.c. Wittmann: Structural properties and topological defects of swollen polymeric mesophases: Low angle X-ray diffraction and optical microscopic studies. *J. Colloid Interface Sci.* 1982. **87**, 356-374.
188. F. Reiss-Husson: Structure des phases liquide-cristallines de différents phospholipides, monoglycérides, sphingolipides, anhydres ou en présence d'eau. *J. Mol. Biol.* 1967. **25**, 363-382.
189. D.M. LeNeveu, R.P. Rand, V.A. Parsegian, and D. Gingell: Measurement and modification of forces between lecithin bilayers. *Biophys. J.* 1977. **18**, 209-230.
190. K.M.G. Taylor and R.M. Morris: Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochim. Acta.* 1995. **248**, 289-301.
191. A.S. Ulrich, M. Sami, and A. Watts: Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1994. **1191**, 225-230.
192. N.M. Sanina and E.Y. Kostetskii: Effect of hydration on the phase transition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from marine invertebrates and lower chordates. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 1996. **32**, 44-49.
193. B. Wang and F. Tan: DSC study of phase transition of anhydrous phospholipid DHPC and influence of water content. *Sci. China, Ser. B: Chem.* 1997. **40**, 412-418.
194. N. Markova, E. Sparr, L. Wadsö, and H. Wennerström: A calorimetric study of phospholipid hydration. simultaneous monitoring of enthalpy and free energy. *J. Phys. Chem. B.* 2000. **104**, 8053-8060.
195. H. Pfeiffer, H. Binder, G. Klose, and K. Heremans: Hydration pressure and phase transitions of phospholipids: II. Thermotropic approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2003. **1609**, 148-152.
196. S.D. O'Neill, Leopold, A.C.: An Assessment of Phase Transitions in Soybean Membranes. *Plant Physiol. (Rockv.).* 1982. **70**, 1405-1409.
197. P.S. Coppock and J.T. Kindt: Atomistic simulations of mixed-lipid bilayers in gel and fluid phases. *Langmuir.* 2009. **25**, 352-359.
198. A. Blume: Apparent molar heat capacities of phospholipids in aqueous dispersion. Effects of chain length and head group structure. *Biochemistry.* 1983. **22**, 5436-5442.
199. G.L. Jendrasiak and J.H. Hasty: The hydration of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. **337**, 79-91.
200. G.L. Jendrasiak and R.L. Smith: The effect of the choline head group on phospholipid hydration. *Chem. Phys. Lipids.* 2001. **113**, 55-66.
201. X. Yu, A.R. Schmidt, L.A. Bello-Perez, and S.J. Schmidt: Determination of the bulk moisture diffusion coefficient for corn starch using an automated water sorption instrument. *J. Agric. Food Chem.* 2008. **56**, 50-58.
202. R. Ruan, S.J. Schmidt, A.R. Schmidt, and J.B. Litchfield: Nondestructive measurement of transient moisture profiles and the moisture diffusion coefficient in a potato during drying and absorption by NMR imaging. *Journal of Food Process Engineering.* 1991. **14**, 297-313.
203. J. Crank, *The mathematics of diffusion - Second Edition.* 1. Diffusion - Mathematical model. (Oxford)1975 CPI Bath
204. M. Orsi, W.E. Sanderson, and J.W. Essex: Permeability of small molecules through a lipid bilayer: A multiscale simulation study. *J. Phys. Chem. B.* 2009. **113**, 12019-12029.
205. D. Marsh: Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. **1286**, 183-223.
206. G. Montalvo and A. Khan: Self-assembly of mixed ionic and zwitterionic amphiphiles: Associative and dissociative interactions between lamellar phases. *Langmuir.* 2002. **18**, 8330-8339.

207. R.A. Demel, W.S.M. Geurts van Kessel, and L.L.M. van Deenen: The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. **266**, 26-40.
208. C.J. Högberg and A.P. Lyubartsev: A molecular dynamics investigation of the influence of hydration and temperature on structural and dynamical properties of a dimyristoylphosphatidylcholine bilayer. *J. Phys. Chem. B.* 2006. **110**, 14326-14336.
209. M.T. Hyvönen and P.T. Kovanen: Molecular dynamics simulations of unsaturated lipid bilayers: Effects of varying the numbers of double bonds. *Eur. Biophys. J.* 2005. **34**, 294-305.
210. J. Taylor, N.E. Whiteford, G. Bradley, and G.W. Watson: Validation of all-atom phosphatidylcholine lipid force fields in the tensionless NPT ensemble. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2009. **1788**, 638-649.
211. N. Kucerka, S. Tristram-Nagle, and J.F. Nagle: Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* 2006. **208**, 193-202.
212. K. Belohorcova, J. Qian, and J.H. Davis: Molecular dynamics and <sup>2</sup>H-NMR study of the influence of an amphiphilic peptide on membrane order and dynamics. *Biophys. J.* 2000. **79**, 3201-3216.
213. K. Hristova and S.H. White: Determination of the hydrocarbon core structure of fluid dioleoylphosphocholine (DOPC) bilayers by x-ray diffraction using specific bromination of the double-bonds: Effect of hydration. *Biophys. J.* 1998. **74**, 2419-2433.
214. K. Murzyn, T. R<sup>3</sup>g, G. Jeziński, Y. Takaoka, and M. Pasenkiewicz-Gierula: Effects of phospholipid unsaturation on the membrane/water interface: A molecular simulation study. *Biophys. J.* 2001. **81**, 170-183.
215. R.J. Mashl, H.L. Scott, S. Subramaniam, and E. Jakobsson: Molecular simulation of dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers at differing levels of hydration. *Biophys. J.* 2001. **81**, 3005-3015.
216. S. Nagle, Y. Liu, J. Legleiter, and J.F. Nagle: Structure of gel phase DMPC determined by x-ray diffraction. *Biophys. J.* 2002. **83**, 3324-3335.
217. S.J. Marrink, J. Risselada, and A.E. Mark: Simulation of gel phase formation and melting in lipid bilayers using a coarse grained model. *Chem. Phys. Lipids.* 2005. **135**, 223-244.
218. A.K. Sum, R. Faller, and J.J. De Pablo: Molecular Simulation Study of Phospholipid Bilayers and Insights of the Interactions with Disaccharides. *Biophys. J.* 2003. **85**, 2830-2844.
219. U. Essmann, L. Perera, and M.L. Berkowitz: The origin of the hydration interaction of lipid bilayers from MD simulation of dipalmitoylphosphatidylcholine membranes in gel and liquid crystalline phases. *Langmuir.* 1995. **11**, 4519-4531.
220. P.S. Coppock and J.T. Kindt: Determination of phase transition temperatures for atomistic models of lipids from temperature-dependent stripe domain growth kinetics. *J. Phys. Chem. B.* 2010. **114**, 11468-11473.
221. Y.N. Kaznessis, S. Kim, and R.G. Larson: Simulations of zwitterionic and anionic phospholipid monolayers. *Biophys. J.* 2002. **82**, 1731-1742.
222. S. Baoukina, L. Monticelli, S.J. Marrink, and D.P. Tieleman: Pressure-area isotherm of a lipid monolayer from molecular dynamics simulations. *Langmuir.* 2007. **23**, 12617-12623.
223. J.W. Munden and J. Swarbrick: Effect of spreading solvent on monolayer characteristics of dipalmitoyl lecithin. *J. Colloid Interface Sci.* 1973. **42**, 657-659.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Michel LAGARDE, Professeur, Université de Lyon, Villeurbanne**

**Monsieur Christophe RAMSEYER, Professeur, Université de Franche-Comté, besançon**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame SAUTOT Pascale**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Propriétés d'auto-assemblage de phospholipides riches en acides gras polyinsaturés :  
caractérisations physico-chimiques et simulation de bicouche par dynamique  
moléculaire."**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 29 mai 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



---

## Propriétés d'auto-assemblage de phospholipides riches en acides gras polyinsaturés : caractérisation physico-chimique et simulation de bicouches par dynamique moléculaire

---

La littérature des dernières décennies regorge de références concernant les bienfaits des acides gras oméga 3, tels que l'EPA (C20:5 n-3) et le DHA (C22:6 n-3) qui jouent un rôle essentiel dans la prévention de nombreuses pathologies comme les maladies neurodégénératives (type Alzheimer). Les sources majeures d'EPA et DHA sont celles d'origine marine. C'est dans ce contexte que cette étude a choisi de s'intéresser aux phospholipides provenant de têtes de saumon. L'objectif était de les extraire, de purifier la phosphatidylcholine (PC) issue du mélange de lipides et d'en déterminer ses propriétés d'auto-assemblage en bicouches. Une approche expérimentale par la caractérisation physico-chimique de ce PC a été complétée par une étude théorique du même composé en utilisant les techniques de simulation par dynamique moléculaire qui a permis une caractérisation à l'échelle moléculaire des bicouches lipidiques. La caractérisation a permis d'aboutir au profil détaillé de la composition du mélange PC saumon, d'élaborer le diagramme de phase PC –eau, de déterminer les propriétés d'empaquetage d'hydratation de ce lipide. Les paramètres choisis pour l'étude en dynamique moléculaire ont permis de reproduire de manière fidèle les résultats expérimentaux, validant ainsi le modèle et les conditions de simulations déterminés au préalable. La caractérisation des propriétés structurales de la PC de saumon sous forme de multicouches a permis d'approfondir la compréhension des mécanismes d'interactions à l'échelle moléculaire existant entre les lipides insaturés eux-mêmes.

Mots-clés : monocouche lipidique / AGPI longue chaîne / structure membranaire / Transition de phase / Phosphatidylcholine / Hydratation des phospholipides / Saumon

---

Properties of self-assembled phospholipids enriched in long chain  
polyunsaturated fatty acids: physico-chemical characterization and simulation of  
bilayers using molecular dynamics

---

The literature of recent decades is replete with references regarding the benefits of omega 3 fatty acids such as EPA (C20:5 n-3) and DHA (C22:6 n-3) which play an essential role in preventing many diseases such as neurodegenerative diseases (Alzheimer's type). The major sources of EPA and DHA are those of marine origin. It is within this context that this study chose to deal with phospholipids from salmon heads. The objective was to extract, purify phosphatidylcholine (PC) derived from the mixture of lipids and determine its properties of self-assembly into bilayers. An experimental approach by the physicochemical characterization of this PC was supplemented by a theoretical study of the same compound using the techniques of molecular dynamics simulation that allowed a molecular-scale characterization of lipid bilayers. The characterization resulted in detailed profile of the mixture composition of salmon PC, to draw up the phase diagram of PC-water, to determine the packing and hydration properties of this lipid. The parameters chosen for the study of molecular dynamics have faithfully reproduced the experimental results, thus validating the model and simulation conditions determined in advance. The characterization of structural properties of the PC as a multilayer salmon has deepened the understanding of interaction mechanisms at the molecular level between unsaturated lipids themselves.

Keywords: Lipid monolayer / Long-chain PUFA / Membrane structure / Phase transition / Phosphatidylcholine / Phospholipids hydration / Salmon