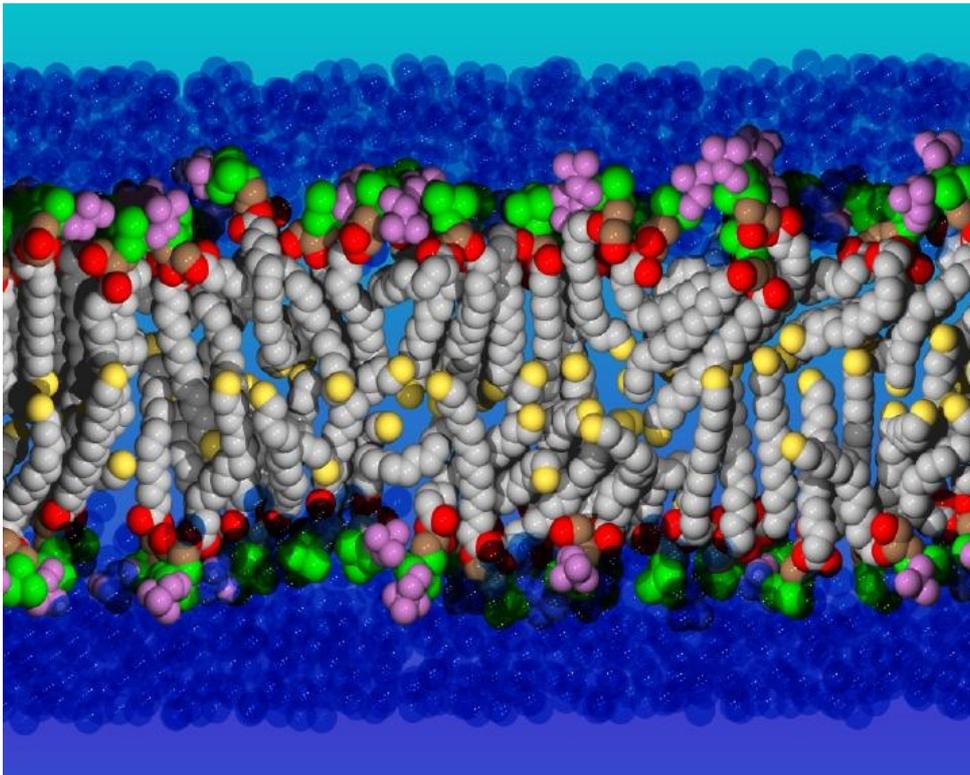


Etude de l'effet du calcium sur différents lipides par RMN solide



Rapport du stage effectué à l'Institut de Biologie Physico-Chimique
du 23 janvier au 8 février 2006

Lionel LUMBROSO

Timothée THEVENEUX-PELZER

Licence de physique
Table des matières

Informations générales	Page 3
présentation de l'IBPC	Page 3
présentation du laboratoire	Page 3
Sujet du stage	Page 4
lipides et membranes biologiques	Page 4
Résonance Magnétique Nucléaire	Page 4
sujet d'étude du stage	Page 5
Travail réalisé	Page 7
préparation des échantillons	Page 7
spectroscopie RMN	Page 7
résultats et commentaires	Page 8
Bilan personnel: Lionel LUMBROSO	Page 11
Bilan personnel: Timothée THEVENEUX-PELZER	Page 12
Références bibliographiques	Page 13
Table des figures	Page 13

Informations générales

Présentation de l'IBPC

A l'origine de l'Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC), on trouve deux hommes : Jean Perrin, Prix Nobel de Physique en 1926, pour ses travaux sur la structure atomique de la matière, et le Baron Edmond de Rothschild, banquier et grand philanthrope. Esprit très ouvert, Jean Perrin s'intéressait à la nature des rayons cathodiques, au mouvement brownien, à l'astrophysique mais aussi à la chimie physique et à la biologie. Le Baron Edmond de Rothschild a été le mécène qui a permis l'édification de l'Institut de Biologie Physico-Chimique, terminé en 1930 et considéré alors comme le laboratoire le plus moderne de France.

L'IBPC se décompose en 5 départements : Biochimie Théorique, Régulation de l'expression génétique chez les micro-organismes, Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques, Biologie cellulaire et moléculaire de la sécrétion, Physiologie membranaire et moléculaire du Chloroplaste.

L'Institut de Biologie Physico-Chimique, qui relève des Départements des Sciences de la Vie et des Sciences Chimiques du CNRS, a gardé l'ouverture d'esprit des fondateurs et demeure un lieu privilégié de recherche pluridisciplinaire.

Présentation du laboratoire

Nous avons effectué notre stage au laboratoire de physico-chimie moléculaire des membranes biologiques, sous la direction de Dror WARSCHAWSKI. L'organisation et la dynamique des protéines et lipides membranaires dans des systèmes naturels (cellules vivantes) ou artificiels (vésicules lipidiques, micelles, bicelles) est un des sujets d'intérêt majeur de ce laboratoire. Parmi les problématiques abordées figure l'étude de l'asymétrie de la distribution transversale des phospholipides entre les deux monocouches composant une membrane, des mécanismes conduisant à cette asymétrie, ainsi que de ses conséquences physiques et biologiques (bourgeonnement, invagination, relation avec endocytose et exocytose...).

Ce laboratoire utilise la technique de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour analyser les structures et la dynamique des protéines en solution, mais s'attache également au développement de techniques d'analyse par RMN solide.

Le spectromètre RMN est situé au département de chimie de l'Ecole Normale Supérieure rue Lhomond, à proximité de l'IBPC. La préparation des différents échantillons a été faite à l'IBPC et les analyses RMN à l'ENS.

Sujet du stage

Lipides et membranes biologiques

Les lipides sont une classe de molécules organiques amphiphiles, c'est-à-dire constituées d'une "tête" polaire hydrophile et d'une "queue" hydrophobe constituée d'une ou plusieurs chaînes carbonées aliphatiques. Il existe de nombreuses classes de lipides. Parmi elles on trouve les glycérophospholipides, plus couramment

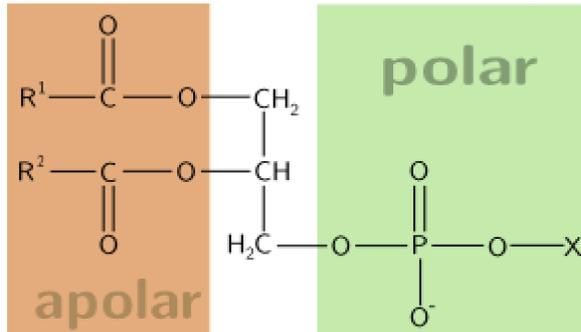


Fig.1: Formule générale d'un phospholipide; R1 et R2 sont deux chaînes carbonées et X un groupe polaire

appelés phospholipides, constitués d'un glycérol trisubstitué par deux chaînes carbonées (c'est la queue apolaire) et par un groupe phosphatidyl (c'est la tête polaire). Ce sont les phospholipides qui pour la plupart constituent les membranes biologiques.

Les lipides sont insolubles dans l'eau, et comme toutes les molécules amphiphiles elles forment des micelles en présence d'eau, soit en dirigeant la tête vers une ou plusieurs molécules d'eau au centre, soit au contraire en dirigeant la tête polaire vers l'extérieur s'il y a beaucoup d'eau.

Mais les lipides peuvent également, en présence de suffisamment d'eau former des bicouches. Dans cette conformation on a deux couches de lipides, les queues étant dirigées vers le plan médian, les têtes vers l'eau. Ces bicouches constituent ce qu'on appelle un cristal liquide. En effet en

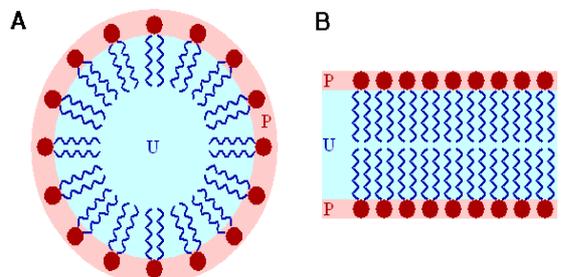


Fig.2: Schéma de lipides en présence d'eau; A: en micelle; B: en bicouche

raison du caractère amphiphile des lipides, ces molécules ne peuvent traverser la bicouche de part en part, mais elles peuvent se déplacer parallèlement au plan médian de la bicouche. Les bicouches ont donc un comportement solide (ou cristallin) dans une dimension et liquide dans les deux autres. Le comportement des bicouches varie en fonction de la température. En effet si la température

descend suffisamment, les lipides cessent de se déplacer: on observe une transition de phase vers la phase gel, où les lipides sont immobiles dans les trois dimensions.

Les cellules biologiques sont constituées de vésicules formées de telles bicouches (ou bicelles) auxquelles sont accrochées quantités de protéines aux fonctions diverses et variées (pompes à ions, filtres, marqueurs biologiques, etc.).

Le laboratoire Physico-Chimie des membranes biologiques s'intéresse à tous les aspects des membranes, mais notre encadrant, Dror WARSCHAWSKI (directeur de recherche) s'intéresse plus particulièrement aux lipides, et notamment à leur étude par spectroscopie par RMN.

Résonance Magnétique Nucléaire

La spectroscopie par RMN repose sur l'existence du spin des noyaux atomiques. Comme pour les électrons il est caractérisé par un nombre quantique de spin qui peut être entier ou demi-entier. Par exemple pour le proton ^1H ou pour le phosphore ^{31}P ce nombre peut prendre les valeurs $1/2$ ou $-1/2$, comme pour l'électron.

En l'absence de champ magnétique extérieur les deux états sont dégénérés: ils ont

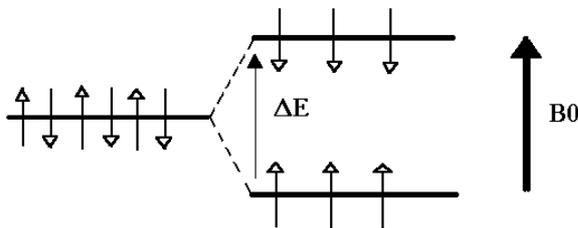


Fig.3: Levée de dégénérescence des états de spin d'un noyau en présence d'un champ magnétique

la même énergie. Mais en présence d'un champ magnétique extérieur \mathbf{B}_0 , on lève cette dégénérescence: les deux états de spins sont alors sur deux niveaux d'énergie. La différence d'énergie entre ces deux niveaux s'écrit: $\Delta E = \gamma \hbar B_0$, où γ est le rapport gyromagnétique, caractéristique du noyau considéré (cf. figure 3). Cette différence d'énergie est

donc caractérisée par une fréquence d'émission ν telle que $\Delta E = h\nu$, qui est la fréquence du photon émis par un noyau lorsqu'il passe d'un niveau haut (spin ↓) à un niveau bas (spin ↑).

Chaque noyau est donc caractérisé par une fréquence d'absorption ν_0 pour laquelle le noyau absorbe l'onde électromagnétique puis se désexcite en libérant une onde de même fréquence: c'est l'effet Zeeman. Cette fréquence de résonance ν_0 , ou fréquence de Larmor dépend du champ magnétique extérieur: $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$. Par exemple la fréquence de résonance à 9,3950 T est de 400,000 MHz pour le proton et de 161,923 MHz pour le phosphore 31. Notons que certains noyaux comme le carbone 12 ont un spin nul et n'ont donc pas de fréquence de résonance RMN. On doit donc, en balayant toutes les fréquences à champ magnétique constant, observer des pics d'absorption correspondant exactement aux fréquences de résonance des éléments contenus dans l'échantillon étudié.

Mais en réalité l'étude fine du spectre d'absorption montre que tous les noyaux d'un même isotope ne résonnent pas exactement à la même fréquence. Cette différence par rapport à la fréquence théorique est de l'ordre de quelques millièmes de la fréquence théorique ν_0 . On appelle déplacement chimique la différence de la fréquence de résonance mesurée et de la fréquence de Larmor. Cette différence est mesurée en millièmes de la fréquence ν_0 ou partie par million (ppm). Cet effet fin est essentiellement dû à l'anisotropie du nuage électronique du noyau considéré.

Les molécules de phospholipides étudiées ne contiennent qu'un seul atome de phosphore, d'où l'intérêt de la RMN du ^{31}P . Par la suite on ne s'intéressera plus qu'à la RMN du phosphore sauf mention contraire.

Du point de vue de la mécanique quantique on peut faire un développement limité de l'hamiltonien H correspondant au noyau en présence de \mathbf{B}_0 en considérant les deux premiers termes: $H = H_z + H_d + \dots$. H_z , l'hamiltonien Zeeman est le terme prépondérant (correspondant à la fréquence ν_0). H_d est l'hamiltonien dipolaire qui prend en compte le caractère dipolaire du système {noyau+nuage électronique}. C'est ce terme qui est responsable du déplacement chimique. Si le nuage électronique est sphérique $H_d = 0$. L'hamiltonien dipolaire est proportionnel à $(3\cos^2 \theta - 1)$ où θ est l'angle entre le dipôle et le champ magnétique \mathbf{B}_0 .

Sujet d'étude du stage

La vitesse de déplacement des molécules joue donc un rôle primordial dans l'allure du spectre fin observé. En phase liquide l'effet dipolaire est moyenné à zéro car θ varie très rapidement; on observe un pic à 0ppm c'est à dire à la fréquence de Larmor du noyau considéré. Pour un cristal liquide on observe un spectre de la forme

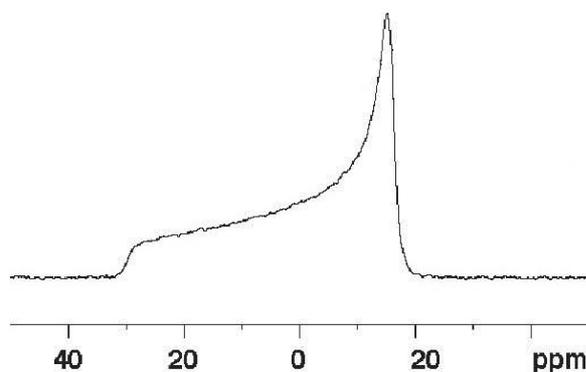


Fig.4: Spectre RMN P de la DOPC seule

de la Figure 4. En fait plus le dipôle, c'est-à-dire plus la molécule bouge rapidement, et plus la bande ou le pic sont fins. En particulier si l'on diminue la température d'une bicouche le spectre s'élargit, et en phase gel le spectre est très large.

La température n'est pas le seul paramètre qui fait varier la mobilité des lipides en bicouches. En effet pour des lipides ayant une tête polaire anionique la présence de cations comme le Ca^{2+} diminue la mobilité des molécules. Cet

effet est donc observable par RMN.

Le but de cette étude a été d'observer par la RMN l'effet du calcium sur deux lipides, la (DO)PC¹ dont la tête est neutre, et la (DO)PS² dont la tête est chargée négativement, ainsi que de distinguer ces effets sur des mélanges des deux. En raison de la neutralité de la tête de la PC on s'attend à ce que l'effet du calcium soit nettement plus intense sur la PS que sur la PC.

Cette étude s'inscrit plus généralement dans le cadre de recherches menées par

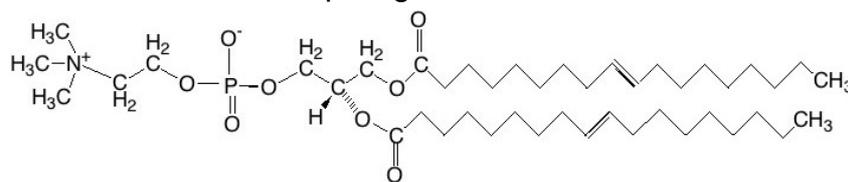


Fig.5: Formule semi-développée de la DOPC

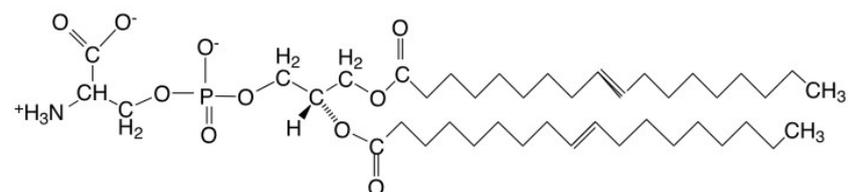


Fig.6: Formule semi-développée de la DOPS

M. WARSCHAWSKI depuis plus d'un an sur des mélanges de lipides qui consistent à tenter de distinguer par RMN les effets de différents facteurs sur chaque lipide. Parmi les études réalisées: le comportement du mélange PE³/PC/cholestérol à 1/1/1 en fonction de la température, celui du

mélange PC/SM⁴/cholestérol en fonction de la concentration de cholestérol etc. .

Notons que la PS, la PC, la PE et la SM sont les quatre lipides majoritaires des membranes de globules rouges.

¹ (DiOléoyl)PhosphatidylCholine

² (DiOléoyl)PhosphatidylSérine

³ PhosphatidylEthanolamine

⁴ SphingoMyéline

Travail réalisé

Préparation des échantillons

Les membranes réagissent essentiellement sous l'effet d'espèces chimiques chargées. L'ion Ca^{2+} par exemple, s'accroche préférentiellement sur la DOPS (1 mole de Ca^{2+} pour 2 moles de DOPS), que sur la DOPC. Nous avons réalisé plusieurs échantillons lipidiques; chaque échantillon doit contenir 50% de lipides et 50% d'eau, soit 100 mg de lipides et 100mg (ou 100 μL) d'eau. Les lipides utilisés étant des espèces acido-basiques on utilise à la place de l'eau un tampon à pH 7. Entre les différents échantillons, on choisit d'insérer tel ou/et tel autre lipide avec ou sans calcium, en faisant varier leurs nombres de moles respectifs.

Le tampon a une composition suivante: 100 mM NaCl 100 mM TRIS 2mM EDTA. D'une manière générale les tampons sont utilisés pour reproduire les conditions de vie en milieu biologique.

Pour des raisons pratiques on dissout le sel de chlorure de calcium préalablement dans du tampon dans une concentration bien choisie pour pouvoir ajouter plus facilement le calcium au(x) lipide(s).

Pour les échantillons contenant deux types de lipides, il faut au préalable les mélanger avec un solvant organique ce qui permet de rendre les concentrations de chacun des deux lipides bien uniformes sur toutes les bicouches. On introduit dans un flacon la quantité totale de DOPS et de DOPC (en fonction du nombre d'échantillon que l'on désire avoir), puis on y verse un mélange de solvant chloroforme/méthanol 2/1 jusqu'à obtenir 50 mL de solution lipidique. Puis on évapore le solvant à l'évaporateur rotatif. Cette étape de dissolution puis évaporation doit être faite 3 fois (c'est le protocole standard du labo). Une fois que l'on a terminé, on a éliminé pratiquement tout le solvant contenu dans le ballon. Pour éliminer d'éventuelles traces encore présentes, on relie les ballons à une pompe à vide pendant une dizaine d'heures.

Pour les échantillons à base d'un seul lipide, cette étape n'est pas nécessaire.

A ce stade, les échantillons ne contiennent que les lipides. Il faut y rajouter ensuite les quantités de tampon et de calcium correspondant à la quantité de lipide. Enfin il faut réaliser 3 cycles de congélation (15 min)/décongélation (5 min au bain-marie) pour pouvoir organiser les lipides en membrane. Il s'agit en fait de faire des transitions de phase cristal liquide-phase gel (cf. supra) pour favoriser la formation de bicouches.

Une fois les échantillons préparés, il faut les transférer dans un petit cylindre de quelques millimètres de diamètre surmonté d'un bouchon à pales appelé rotor que l'on introduira dans le spectromètre RMN (un rotor pour chaque échantillon).

Spectroscopie RMN

Le spectromètre RMN est entre autres constitué d'un électroaimant, d'une interface informatique permettant le traitement des données, ainsi que d'une console contenant des amplis haute puissance pour amplifier le signal faible, étant donné la petite quantité de solide introduite. L'électroaimant contient une bobine

supraconductrice dont le rôle est de créer un champ magnétique relativement uniforme. Pour assurer la supraconductivité de la bobine, l'aimant doit être refroidi avec de l'hélium liquide qui doit être lui-même refroidi avec de l'azote liquide pour des raisons de coût (l'azote liquide est beaucoup moins cher). L'hélium et l'azote s'évaporent lentement; il faut donc changer l'azote tous les 7 à 10 jours environ et l'hélium deux fois par an.

On introduit dans l'aimant une sonde dans laquelle on placera le rotor. C'est cette sonde qui d'une part envoie les impulsions électromagnétiques et qui d'autre part mesure la réponse de l'échantillon. Enfin cette sonde permet grâce à un système d'air comprimé de faire tourner le rotor très rapidement (d'où son nom) autour d'un axe ayant un angle de $54^{\circ}44'$ avec le champ magnétique B_0 . Cet angle θ est appelé angle magique et annule la quantité $(3\cos^2\theta - 1)$. Ceci permet d'aligner tous les dipôles le long de cet axe, et donc de supprimer l'effet d'anisotropie de déplacement chimique (cf. supra). On doit dans ce cas observer un seul pic à 0 ppm. On parle de RMN à rotation à angle magique (MAS pour Magic Angle Spinning) par opposition à la RMN statique où l'on observe une bande large (cf. figure 4).

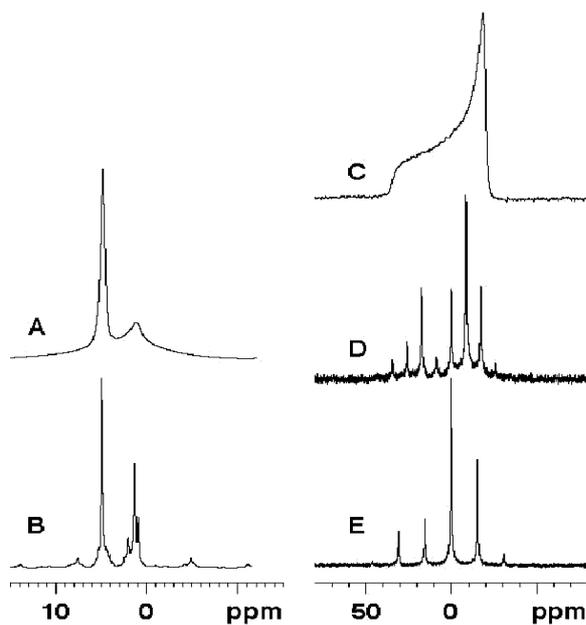


Fig.7: Spectres RMN de la DOPS seule
A et B: spectres H statiques (A) et MAS à 2500Hz
C, D et E: spectres P statiques (C) et MAS à 1400Hz (D) et à 2500 Hz (E)

Dans la pratique on observe un effet d'écho: outre le pic à 0 ppm on trouve des pics de la même forme à intervalles réguliers. Leur intensité varie de telle sorte que les pics aient pour enveloppe le spectre statique correspondant. L'intervalle entre les pics est exactement la fréquence de rotation du rotor. Cette technique est très utilisée en RMN solide, et a permis dans ce stage de faire des vérifications préalables (a-t-on bien pris le bon échantillon ? ...).

Notons que pour chaque spectre il est nécessaire de faire plusieurs fois la mesure et de sommer les signaux obtenus. En effet l'intensité du bruit par rapport à l'intensité du signal est inversement proportionnelle au carré du nombre de mesures (nombre de scans), d'où la nécessité pour certaines des expériences présentées ultérieurement d'être faites sur une longue durée.

Pour l'exemple on présente dans la figure 7 des spectres protons de la PS (A et B); pour le spectre statique (A) le grand pic à 4.8 ppm est le pic des protons de l'eau, et l'autre pic celui des protons des lipides. On observe l'effet d'écho dû à la rotation mais pas aussi bien que sur les spectres phosphores (C, D et E). Pour les spectres MAS on voit très bien que l'intervalle entre les pics diminue avec la fréquence de rotation, et on devine l'allure du spectre statique (C).

On expose ici quelques-uns des résultats obtenus lors de cette étude. Le

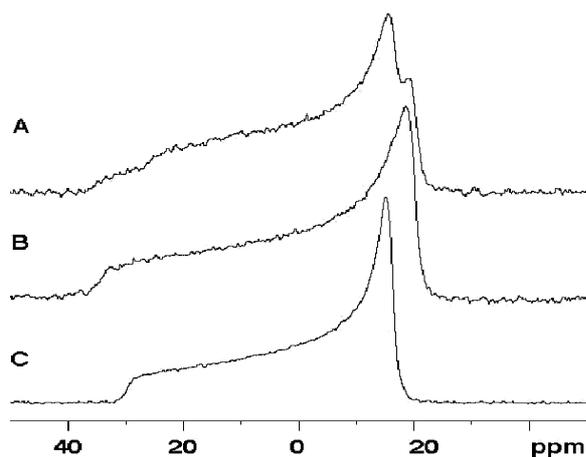


Fig.8: Spectres de la PC seule (C), de la PS seule (B) et du mélange équimolaire PC+PS (A)

Résultats et commentaires

On expose ici quelques-uns des résultats obtenus lors de cette étude. Le

cadre du stage ne permet bien sûr pas de faire une étude exhaustive de l'action du calcium sur la DOPS et la DOPC. Tous les spectres présentés par la suite sont des spectres statiques du phosphore 31. Quatre séries de spectres sont ici présentés.

La figure 8 présente les spectres comparés de la PC, de la PS et du mélange équimolaire PS/PC. Trois observations:

- le spectre de la PC est décalé de quelques ppm par rapport à celui de la PS; c'était prévisible vu la différence de structure des deux molécules
- le spectre de la PS est plus large que celui de la PC; cela traduit une plus faible mobilité de la PS en bicouches
- le spectre du mélange PC+PS correspond exactement à la somme des deux spectres PC et PS séparés; on distingue plutôt bien les deux extrema malgré le faible écart entre les deux: cela signifie a priori que les deux lipides seuls interagissent peu en bicouches.

La figure 9 présente les spectres comparés de la PC seule et de la PC avec calcium à 50%. On constate que le spectre est quand même élargi bien que la PC soit électriquement neutre. Ceci est dû entre autres que la PC est un zwitterion: elle possède une charge négative sur son phosphate (cf. figure 5).

L'étude de l'action du calcium sur la PS s'est révélée être quant à elle pleine de surprises (figure 10). En effet lors de la première mesure du spectre de la PS avec du Calcium à 50%, on obtenait apparemment que du bruit. En fait le spectre était tellement élargi et donc plat que tout était masqué par le bruit. Pour palier à ce problème on a donc recommencé la manipulation mais en augmentant le nombre de scans: on a laissé tourner le spectromètre pendant une dizaine d'heures avant d'obtenir le résultat de la figure 10 B. Le spectre est effectivement beaucoup plus large pour la PS avec du calcium en excès, ce qui traduit une très faible mobilité de la PS. Il a fallu faire une petite recherche bibliographique sur ce sujet pour pouvoir expliquer la forme du spectre B.

On a appris en lisant des articles sur ce sujet que la PS en présence de suffisamment de calcium prenait la forme non plus de bicouches, mais d'agrégats rigides montrant toutes les caractéristiques de la phase gel appelés cochléates. Effectivement l'aspect de l'échantillon de PS/Ca 1/1 n'était pas gélatineux comme pour les autres échantillons (qui forment des membranes) mais poudreux. L'observation du spectre B (PS/Ca 1/1) et sa comparaison avec celui de la PS seule montre qu'une partie de la PS est toujours en bicouche: c'est la partie du spectre qui ressemble à celui de la PS seule. La partie

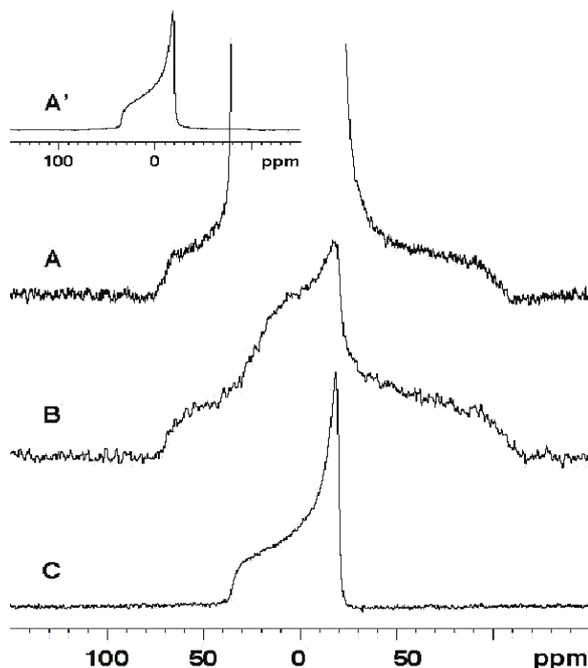


Fig.9: Spectres de la PC seule (B) et en présence de Calcium à 50% (A)

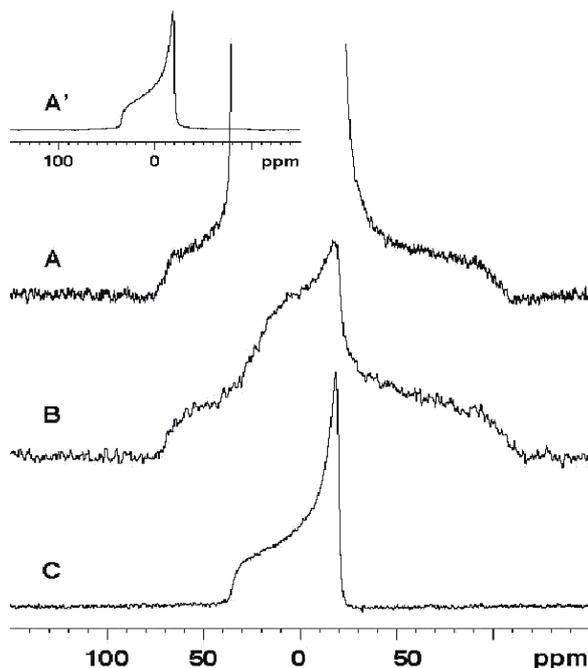


Fig.10: Spectres de la PS seule (C), de la PS en présence de Calcium à 1/1 (B) et à 3/1 (A et A')

très large correspond à la fraction de PS en phase cochléate. Un calcul informatique de l'aire sous la courbe montre qu'environ 85% de la PS est en cochléates et que les 15 % restants sont toujours en bicouches.

En A et A' on a représenté le spectre PS + Calcium mais à 3/1, c'est à dire en dessous de la stœchiométrie car il faut deux PS pour kélater un Ca^{2+} . Sur la vue large (A') on voit que la PS se comporte presque exactement comme si elle était seule. Mais en zoomant sur le pied du spectre A' on voit qu'une partie de la PS est quand même en phase cochléate (cf. A). Le calcul numérique donne 85% de PS en bicouche et 15% de PS en cochléate.

On présente dans la figure 11 une quatrième et dernière comparaison de spectres.

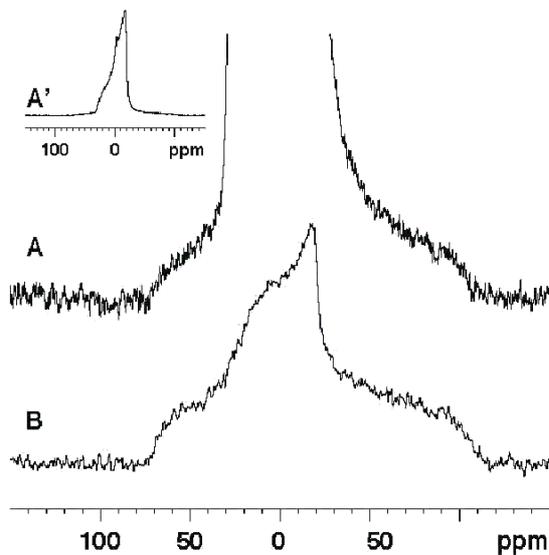


Fig.11: Spectres du mélange PC/PS/Ca 1/1/1 (A et A') et de la PS en présence de calcium à 1/1 (B)

On étudie ici l'action du calcium sur la PS au delà des proportions stœchiométriques en présence ou non de PC. L'étude du spectre PC/PS/Ca 1/1/1 (A et A') montre que 15% de la PS est passé en phase cochléate, les 85% restants ayant les mêmes caractéristiques que le mélange PS/PC (cf. figure 8). Ceci montre que la PC a un effet protecteur sur la PS.

Pour mesurer effectivement la présence de PS en phase cochléate dans cette dernière expérience il a été également nécessaire de faire "tourner" le spectromètre toute une nuit.

Toutes ces expériences ont permis de montrer qu'il est effectivement possible dans une certaine mesure de distinguer les effets du Calcium sur chacun des lipides par RMN.

Bilan personnel: Lionel LUMBROSO

A l'issue de ce stage, je me suis rendu compte que même si l'IBPC était divisé en plusieurs départements, il n' en demeure pas moins que les résultats de certains chercheurs d'une discipline peuvent tout aussi bien intéresser d'autres chercheurs d'une autre discipline : un résultat en biologie peut s'avérer très utile en chimie...

J'ai participé à une série d' expériences prévues par le chercheur sur les interactions possibles entre les membranes cellulaires et leur environnement (en l'occurrence, pour la période du stage, le calcium et les lipides membranaires).

J'ai appris ce que c'est la spectroscopie RMN, une méthode permettant d'analyser les structures et la dynamique d'un échantillon, de quantifier la proportion de tel constituant. C'est un moyen d'investigation structurale extrêmement puissant dans la mesure où les positions - ou déplacements - des différents massifs, ainsi que leur structure fine, peuvent être corrélés à la nature des différents groupements chimiques constituant la molécule.

J'ai eu l'occasion d'avoir un bref aperçu sur le métier des autres chercheurs ou manipulateurs que j'ai côtoyés.

Ce stage m'a permis d'avoir une idée plus précise sur le métier de chercheur.

J'ai eu l'occasion de voir les différentes applications possibles en relation avec ma formation de physique-chimie.

Bilan personnel: Timothée THEVENEUX-PELZER

Ce stage m'a permis de me rendre compte de ce qu'est en général le travail de recherche dans un laboratoire. Tout d'abord l'importance de la recherche bibliographique préalable m'est apparue capitale dans la mesure où les sujets d'étude doivent être mûrement médités avant de passer à la pratique. En effet nous nous sommes trouvés face à un imprévu lors de l'étude de l'action du Calcium sur la PS puisque l'on ne s'attendait pas à avoir un spectre si élargi lorsque le Calcium était en excès. Nous avons dû rechercher la cause de ce fait dans la bibliographie, et cet imprévu aurait pu être évité si la recherche bibliographique préalable avait été plus exhaustive.

De plus j'ai constaté que dans la situation de recherche on devait pouvoir s'adapter facilement à la situation. En effet lorsque l'on a fait le spectre proton de la PS avec du calcium en excès on a observé un pic assez fin et inexpliqué. Pour s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'un phénomène dû à une erreur de manipulation (mauvaise préparation des échantillons), on a dû préparer des échantillons différents, comme de la PS avec de l'eau lourde, ou simplement du tampon pour prendre leurs spectres, et ainsi constater que les manipulations n'avaient pas été faussées.

Troisièmement j'ai appris que l'on devait savoir faire preuve de patience! En effet les étapes de la préparation des échantillons furent assez fastidieuses; mettre 100 mg d'une pâte lipidique visqueuse dans un cylindre de 4 mm de diamètre n'est pas chose aisée, et il faut savoir faire preuve d'une certaine ingéniosité... . D'autre part certaines étapes de la spectroscopie RMN sont également très longues et parfois fastidieuses, et il faut attendre parfois très longtemps pour avoir le résultat tant attendu.

Enfin j'ai été très étonné d'apprendre le coût de certains produits utilisés, comme la DOPS pure (1500 \$ le gramme...). Ceci m'a fait prendre conscience de la responsabilité qu'il y a à manipuler dans le cadre de la recherche.

Je pense que ce stage dans ce laboratoire de l'IBPC m'a permis de prendre conscience de la grande étendue du domaine de recherche des membranes biologiques en général (que ce soit en ce qui concerne les lipides ou les protéines). De plus j'ai appris que la spectroscopie par RMN, et tout particulièrement la RMN des solides est une technique très puissante d'analyse.

Je tire donc un bilan très positif de ce stage d'insertion professionnelle. Mais son cadre s'est révélé être assez étroit. Il fut assez laborieux d'assimiler un grand nombre de connaissances dans un domaine très précis en un temps très limité. La grande quantité de données accumulées au fil des manipulations rend la durée de ce stage assez courte. Cela a pu être assez frustrant car on aurait envie de pousser plus loin cette étude.

Références bibliographiques

- _ *La RMN* D. CANET, J.C. BOUBEL, E. CANET SOULAS; DUNOD
- _ *High resolution proton magnetic resonance of sonicated phospholipids* J.-M. NEUMANN, A. ZACHOWSKI, S. TRAN-DINH, P.F. DEVAUX; *European Biophysics Journal* 11 (1985)
- _ *Infrared and ³¹P-NMR studies of the effect of Li⁺ and Ca²⁺ on phosphatidylserines* H.L. CASAL, H.H. MANTSCH, F. PALTAUF, H. HAUSER; *Biochimica et Biophysica Acta* 919 (1987)
- _ *Calcium binding by phosphatidyl serine headgroups* M. ROUX, M. BLOOM; *Biophysical Journal* vol. 60 (1991)
- _ *Calcium-induced phase separation phenomena in multicomponent unsaturated lipid mixtures* C. P.S. TILCOCK, P. R. CULLIS, S. M. GRUNER; *Biochemistry* 1988 27
- _ *Lipid phase behavior and calcium-induced fusion of phosphatidylethanolamine-phosphatidylserine vesicles* J. SILVIUS, J. GAGNÉ; *Biochemistry* 1984 23
- _ *Calcium-induced fusion and lateral phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidylserine vesicles* J. SILVIUS, J. GAGNÉ; *Biochemistry* 1984 23
- _ *Identification of phosphatidylserine and phosphatidylcholine in calcium-induced phase separated domains* S. W. HUI, L. T. BONI, T. P. STEWART, T. ISAC; *Biochemistry* 1983 23
- _ *Structural effects of neutral lipids on divalent cation-induced interactions of phosphatidylserine-containing bilayers* J. R. COORSSSEN, R. P. RAND; *Biophysical Journal* vol. 68 (1995)
- _ *Sarcolemma phospholipid structure investigated by immunogold electron microscopy and ³¹P NMR spectroscopy with lanthanid ions* C. MOREAU, A. CAVALIER, M. Le FLOCH, J. SEGALEN, C. ROCHER, M. TRAÏKIA, G. LERAY, A. BONDON, D. THOMAS, E. Le RUMEUR; *FEBS Letters* 509 (2001)
- _ *Static and magic angle spinning ³¹P NMR spectroscopy of two natural plasma membranes* C. MOREAU, M. LE FLOCH, J. SEGALEN, G. LERAY, L. METZINGER, J.D. DE CERTAINES, E. LE RUMEUR; *FEBS Letters* 461 (1999)
- _ <http://www.ibpc.fr/UMR7099/>

Table des figures

Fig.1: Formule générale d'un phospholipide	Page 4
Fig.2: Schéma de lipides en présence d'eau	Page 4
Fig.3: Levée de dégénérescence des états de spin	Page 5
Fig.4: Spectre RMN P de la DOPC	Page 6
Fig.5: Formule de la DOPC	Page 6
Fig.6: Formule de la DOPS	Page 6
Fig.7: Spectres RMN de la DOPS seule	Page 8
Fig.8: Spectres PC/PS	Page 8
Fig.9: Spectres PC/Ca	Page 9
Fig.10: Spectres PS/Ca	Page 9
Fig.11: Spectres PC/PS/Ca	Page 10

Nous tenons à remercier M. Dror WARSCHAWSKI ainsi que le reste du personnel du laboratoire pour son accueil, sa disponibilité et sa patience.