

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'INTERACTION D'AGENTS ANTIMICROBIENS ET DE PIGMENTS
ALGAUX EXTRAITS DE DIATOMÉES AVEC LES MEMBRANES CELLULAIRES
D'ESCHERICHIA COLI PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

CATHERINE TARDY LAPORTE

JUILLET 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Dans cette section, je souligne l'appui, l'aide et les encouragements des personnes et organismes qui ont contribué à la réalisation de ce projet. Je remercie d'abord ma directrice de recherche, Isabelle Marcotte (UQÀM) et mon codirecteur, Réjean Tremblay (UQÀR) pour m'avoir accueillie dans leur équipe. Merci de votre encadrement, de vos conseils et de vos encouragements qui m'ont permis d'atteindre mon plein potentiel et de compléter cette étape au meilleur de mes capacités. Je tiens également à remercier le Dr Alexandre Arnold (UQÀM) pour sa grande contribution aux réflexions scientifiques et pour son expertise.

Je tiens à remercier mon directeur de stage, Dr Jean-Luc Mouget (Université du Maine) et mes codirectrices de stage, Dr Michèle Morançais (Université de Nantes) et Dr Nathalie Bourgougnon (Université de Bretagne-Sud) pour m'avoir accueillie dans leurs équipes de recherche. Je remercie la famille Mouget pour leur hébergement au Mans.

Je remercie également les employés de soutien de l'UQÀM et mes collègues au laboratoire Marcotte, Tremblay, Mouget, Morançais et Bourgougnon. Je tiens à remercier tout particulièrement Mathieu Babin (UQÀR), Dr Romain Gastineau (Université du Maine) et Dr Sarah Jenna (UQÀM) ainsi que les membres de son équipe pour leur expertise.

Je remercie aussi les organismes m'ayant soutenue financièrement pour l'avancée des projets, soit le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), le Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT), le Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP), le Réseau Aquaculture Québec (RAQ), le Service des Relations Internationales de l'UQÀM (SRI) et le fonds Suraj Manrao (ISOTEC).

Je remercie également mes parents pour leur soutien financier et pour leurs encouragements. Finalement, je désire remercier mon conjoint Christian et ses enfants Katia, Anabelle et Mélanie pour leur compréhension et pour les compromis qu'ils ont faits pour me permettre de terminer cette étape. Je vous aime.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES UNITÉS	xviii
RÉSUMÉ	xx
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
PROBLÉMATIQUE.....	6
1.1 Résistance aux antibiotiques.....	6
1.2 Modes d'action des antibiotiques courants.....	8
1.3 Phénomène de résistance chez les bactéries	9
1.4 Développement de nouveaux antibiotiques	11
1.5 Le pigment bleu marennine	13
1.6 Bactéries et membranes cellulaires.....	14
1.7 RMN et étude des membranes cellulaires.....	16
1.8 Marquage des membranes	17
1.8.1 Marquage passif	17
1.8.2 Marquage actif.....	19
1.8.3 Marquage actif par utilisation de mutants d' <i>E. coli</i>	20
1.8.4 Avantages et inconvénients des différentes stratégies de marquage	22
1.8.5 Objectifs	23
CHAPITRE II	
CONTEXTE THÉORIQUE.....	24
2.1 RMN du deutérium pour l'étude des membranes.....	24
2.1.1 Théorie générale de la RMN-ÉS	24
2.1.2 La résonance magnétique nucléaire de l'état solide appliquée aux membranes	28

2.1.3	Couplages dipolaires	31
2.1.4	Les interactions quadripolaires.....	32
2.1.5	Séquence d'écho quadripolaire	34
2.1.6	Informations obtenues de l'analyse ^2H RMN-ÉS dans le cas des bicouches de phospholipides.....	35
2.1.7	Analyse ^2H RMN-ÉS de bactéries intactes	37
2.1.8	Phases lipidiques et impact sur le spectre ^2H RMN-ÉS	38
2.1.9	Avantages et inconvénients de l'analyse ^2H RMN-ÉS.....	41
2.2	Biosynthèse des phospholipides chez <i>E. coli</i>	41
2.2.1	Mutants d' <i>E. coli</i> auxotrophes en acide gras exogènes.....	43
2.2.2	Mutants d' <i>E. coli</i> auxotrophes en glycérol et phosphoglycérol	44
2.3	Détermination du profil en acide gras	44
2.3.1	Principe de l'analyse FAME par GC-MS.....	45
2.4	Détermination de la viabilité cellulaire par réduction du MTT	45
2.4.1	Importance de déterminer la viabilité cellulaire.....	45
2.4.2	Principe de la technique	46
2.4.3	Avantages et inconvénients de cette technique	46
2.5	Description des cellules Vero	47
2.6	Principe de la coloration au rouge neutre	47
2.6.1	Avantages et inconvénients de cette technique	47
2.7	Détermination des effets cytotoxiques et antiviraux de la marennine	48
CHAPITRE III		
AN IN VIVO ^2H SOLID-STATE NMR STUDY OF THE EFFECT OF ANTIBACTERIALS ON INTACT NON-MUTATED ESCHERICHIA COLI.....		
3.1	Résumé	50
3.2	Abstract.....	51
3.3	Introduction	52
3.4	Material and Methods.....	54
3.4.1	Materials.....	54
3.4.2	Incorporation of deuterated palmitic acid in <i>E. coli</i> membrane	54
3.4.3	Exposition of <i>E. coli</i> to antimicrobial agents	55
3.4.4	Lipid profile analysis.....	55

3.4.5	Cellular viability assay	56
3.4.6	² H Solid-state NMR analysis and moment analysis	57
3.5	Results	58
3.5.1	Incorporation of deuterated palmitic acid into cellular membranes of <i>E. coli</i>	58
3.5.2	Characterization of intact <i>E. coli</i> cells.....	59
3.6	Effect of antimicrobial agents on intact <i>E. coli</i> cell membranes	62
3.7	Discussion.....	66
3.7.1	Successful ² H labeling of wild-type <i>E. coli</i> membranes	66
3.8	² H-SS-NMR analysis of intact <i>E. coli</i> membranes and response to antimicrobials	68
3.9	Conclusion	72
3.10	Acknowledgements	73
CHAPITRE IV		
EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DU PIGMENT		
MARENINE DE DIATOMÉES DU GENRE HASLEA		
4.1	Introduction	74
4.2	Hypothèses et objectifs	77
4.3	Matériel et Méthode.....	77
4.3.1	Produits utilisés	77
4.3.2	Culture des diatomées bleues	77
4.3.3	Récupération des formes interne et externe des pigments de type marenine	78
4.3.4	Extraction de la forme interne du pigment	78
4.3.5	Préfiltration du milieu de culture contenant la forme externe du pigment	78
4.3.6	Filtration à 30 kD, à 3 kDa et dessalage du pigment.....	79
4.3.7	Purification du pigment par chromatographie d'échange d'anions.....	79
4.3.8	Dessalage par dialyse et récupération par lyophilisation	80
4.3.9	Culture des cellules Vero	80
4.3.10	Lecture des plaques par coloration au rouge neutre	80
4.3.11	Tests de cytotoxicité et d'effet antiviral	81
4.3.12	Traitement statistique des données.....	82
4.4	Résultats et Discussion	82
4.4.1	Production des pigments algaux.....	82

4.4.2	Extraction et purification des formes interne et externe des pigments de type marennine	84
4.4.3	Effets biologiques de la marennine	85
4.5	Conclusion	91
	CONCLUSION	93
	RÉFÉRENCES	99

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Illustration des principales cibles des classes d'antibiotiques les plus communs. Quelques exemples d'antibiotiques sont donnés..	9
1.2	Mécanismes d'action des PAC pour perturber les membranes bactériennes. Les peptides non structurés en solution en (a) le lient à la surface de la bicouche en (b) et (c) pour la perturber en formant des pores structurés comme un barillet (d), des pores de type toroïdal (e) ou en solubilisant la membrane selon un mécanisme tapis (f).	12
1.3	Schématisation de la création de domaines de lipides dans une membrane par l'ajout du lipopeptide polymyxine B.	13
1.4	Schématisation des membranes de bactéries à Gram négatif	15
1.5	Différents mécanismes passifs d'incorporation de lipides exogènes dans des bicouches.	18
2.1	Niveaux d'énergie pour le noyau deutérium ($I = 1$) en absence et en présence du champ magnétique B_0	25
2.2	Direction du moment angulaire de spin (\vec{I}) par rapport au champ magnétique externe B_0	26
2.3	Magnétisation totale résultant de l'orientation non aléatoire des moments magnétiques en présence d'un champ magnétique externe dans un échantillon solide.	27
2.4	Basculement de la magnétisation lors d'une impulsion de radiofréquence équivalente à 90° (a). La magnétisation retourne parallèle au champ magnétique B_0 dans un mouvement de précession au tour de l'axe z pouvant être détectée par la bobine (b)	28
2.5	Schématisation de l'anisotropie de déplacement chimique en RMN-ÉS et de l'impact des orientations possibles des nuages électroniques par rapport à B_0 sur le spectre de poudre	29

2.6	(a) Schématisation d'une bicouche sphérique de structure symétrique composée de phospholipides et (b) distribution des orientations des têtes polaires des phospholipides par rapport à B_0 et (c) le spectre RMN-ÉS résultant	30
2.7	Schématisation du couplage dipolaire entre deux moments magnétiques.....	31
2.8	Modification des niveaux énergétiques due aux interactions quadripolaires	32
2.9	Spectre ^2H RMN-ÉS théorique de vésicules de phospholipides ayant une seule position deutérée le long de la chaîne acyle	33
2.10	Spectre ^2H RMN-ÉS théorique de vésicules arrondies composées de phospholipides ayant des chaînes acyles complètement deutérées	34
2.11	Spectre ^2H RMN-ÉS théorique de vésicules arrondies composées de phospholipides ayant des chaînes acyles complètement deutérées	36
2.12	Conformations possibles des chaînes lipidiques vues de face et de haut.....	37
2.13	Spectre ^2H RMN-ÉS de cellules d' <i>E. coli</i> L51 intactes analysées <i>in vivo</i>	38
2.14	Schématisation de la phase gel et de la phase fluide des membranes ainsi que leurs spectres de ^2H RMN-ÉS respectifs dans le cas de bicouches de 1-docosahexaénoyle -2-palmitoyl -sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol (DPPC) et DPPC ayant les chaînes lipidiques deutérées (DPPC- d_{62} /cholestérol (75 :25))......	39
2.15	Schéma des différents modes de mouvements possibles des phospholipides en bicouche.	40
2.16	Schématisation des principales étapes de la biosynthèse des phospholipides chez <i>E. coli</i> sauvage et les mécanismes d'incorporation des acides gras libres exogènes à longue chaîne aux phospholipides. Les informations inscrites dans les bulles correspondent à des exemples de travaux sur le gène ciblé qui ont conduit à la création ou l'isolement d'une souche d' <i>E. coli</i> présentant un défaut dans ce gène.	42
3.1	^2H -SSNMR spectra of intact non-mutated <i>E. coli</i> acquired at (a) 12, (b) 37 and (c) 55°C. The top of spectrum (c) is truncated.....	61

3.2	^2H -SS-NMR spectra of (a) intact non-mutated <i>E. coli</i> acquired at 37°C and in the presence of (b) PxB, (c) fulleranol and (d) CTAC.	63
3.3	Optical microscopy image of <i>Haslea provincialis</i> with blue apices (intracellular form of the marennine-like pigment).....	65
3.4	^2H -SS-NMR spectra of (a) intact non-mutated <i>E. coli</i> acquired at 37°C and in the presence of (b) intracellular and (c) extracellular forms of the marennine-like pigment from <i>H. provincialis</i>	66
4.1	Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>) ayant des branchies vertes récoltées chez l'ostréiculteur EARL Bonnain à L'Houmeau, France dans la baie de Marennes-Oléron. La photo a été prise par Jean-Luc Mouget en 2010 à l'aide d'un appareil photo Olympus E-500, 50 mm et un objectif ED Macro.	75
4.2	Images prises par microscope optique de différentes souches de diatomées bleues soient (a) <i>H. ostrearia</i> , (b) <i>H. provincialis</i> et (c) <i>H. karadagensis</i>	76
4.3	Effet destructeur de cellules (cytotoxique) et effet protecteur contre le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) (antiviral) de la forme externe des pigments de (a) <i>H. ostrearia</i> et (b) d' <i>H. karadagensis</i> à différentes concentrations.	86
4.4	Effet de protection contre le virus HSV-1 (effet antiviral) des cellules Vero et de destruction (effet cytotoxique) en présence de différentes concentrations de pigments de (a) <i>H. ostrearia</i> et (b) <i>H. karadagensis</i> exprimées sous forme logarithmique.	88
4.5	Effet cytotoxique (pourcentage de destruction) et effet antiviral (pourcentage de protection contre le virus HSV-1 des cellules Vero en présence de différentes concentrations du médicament Zovirax (a) et (b) exprimées de façon logarithmique.....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Mode de résistance des pathogènes aux principales classes d'antibiotiques.....	10
3.1	Fatty acid composition of the membranes of labeled and unlabeled non-mutated <i>E. coli</i>	58
3.2	MTT reduction activities of labeled <i>E. coli</i> after exposition to antimicrobials with percentage compared to cells at harvest after rinsing.....	59
3.3	Spectral moment analysis of the ² H-SS-NMR spectra of labeled <i>E. coli</i> obtained at different temperatures.....	60
3.4	Spectral moment analysis of the ² H-SS-NMR spectra of labeled <i>E. coli</i> obtained in the presence of different antimicrobials.....	63
4.1	Densité cellulaire des cultures d' <i>H. provincialis</i> et <i>H. karadagensis</i> sous différentes intensités lumineuses.....	83
4.2	CX ₅₀ calculée à partir des régressions linéaires des effets antiviraux et cytotoxiques de la forme externe des pigments d' <i>H. ostrearia</i> et d' <i>H. karadagensis</i> et du médicament Zovirax à différentes concentrations exprimées sous forme logarithmique.....	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES

ACP	Protéine transporteuse de groupement acyle (<i>acyl carrier protein</i>)
ACS	<i>American Chemical Society</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AL	Alabama
AMP	<i>Antimicrobial peptide</i>
ARN	Acide ribonucléique
ASW	Eau de mer artificielle (<i>artificial sea water</i>)
AZ	Arizona
B	Champ magnétique local
B ₀	Champ magnétique externe
¹³ C	Isotope de masse 13 du carbone
C- ² H	Liaison carbone-deutérium (<i>carbon-deuterium bond</i>)
C-O	Liaison carbone oxygène
CA	Californie (<i>California</i>)
CC ₅₀	Concentration cytotoxique tuant 50 % par rapport au contrôle
CE ₅₀	Concentration effective antivirale où 50% des cellules infectées par le virus sont non détruites par rapport au contrôle
CFI	<i>Canada foundation for innovation</i>

CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane (<i>dichloromethane</i>)
CL	Cardiolipine (<i>cardiolipin</i>)
CO ₂	Dioxyde de carbone
CoA	Coenzyme A
CTABromide	Bromure de cétyltriméthylammonium (<i>trimethylammonium bromide</i>)
CTAC	Chlorure de cétyltriméthylammonium (<i>cetyltrimethyl ammonium chloride</i>)
CX ₅₀	Concentration qui tue ou a un effet sur 50% des cellules par rapport au contrôle
DHA	Acide docosahexaénoïque
di-6:0 PE	dicaproyl-phosphatityléthalamine
di-6:0 PS	dicaproyl-phosphatidylsérine
DMPC	dimyristoylphosphocholine
DMSO	Diméthylsulfoxyde (<i>dimethylsulfoxide</i>)
DO _{contrôle}	Densité optique de cellules seules
DO _{témoin}	Densité optique de cellules exposées au virus
DO _{test cyto.}	Densité optique de l'échantillon testé contenant l'agent et les cellules
DO _{test viral}	Densité optique de l'échantillon testé contenant l'agent, les cellules et le virus
DOPC	dioléylphosphocholine (<i>diolelyphosphocholine</i>)
DPC	Dodécylphosphocholine (<i>dodecylphosphocholine</i>)
DPPC	1-docosahexaénoyl-2-palmitoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol (<i>1-docosahexaenoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol</i>)
DPPC-d ₆₂	1-docosahexaénoyl-2-palmitoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol ayant les chaînes lipidiques deutérées (<i>1-docosahexaenoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol with deuterated lipid chain</i>)
DPPG	1-docosahexaénoyl-2-palmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (<i>1-docosahexaenoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>)

EPA	Acide icosapentaénoïque
ExP	Pigment externe (<i>external pigment</i>)
ext.	Forme externe
$f(\omega)$	Intensité de la fréquence (<i>Intensity of frequency</i>)
FA	Acide gras (<i>fatty acid</i>)
FAME	Méthyl ester d'acide gras (<i>fatty acid methyl ester</i>)
FID	Signal de precession libre (<i>free induction decay</i>)
FRQNT	Fonds de Recherche du Québec - Nature et les Technologies
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (<i>gas chromatography mass spectrometry</i>)
GRASP	Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines
^1H	Proton
^2H	Deutérium (<i>deuterium</i>)
\hbar	Constante de Planck divisée par 2π
HDO	Eau partiellement deutérée (<i>Semiheavy water</i>)
HSV	Herpes simplex
HSV-1	Herpes simplex de type 1
I	Nombre quantique de spin
\vec{I}	Moment angulaire de spin
ID ₅₀	Dose causant l'infection de 50% des cellules de l'échantillon
ISMER	Institut des sciences de la mer de Rimouski
k	Kilo
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharide (<i>Lipopolysaccharide</i>)

InP	Pigment interne (<i>internal pigment</i>)
M ₀	Magnétisation résultante
M ₁	Premier moment spectral (<i>first spectral moment</i>)
M ₂	Deuxième moment spectral (<i>second spectral moment</i>)
MA	Massachusetts
MDR	Résistant à plusieurs médicaments (<i>multiple drug-resistant</i>)
ME	Marennine externe
MEM	Milieu minimum essentiel d'Eagle
MeOH	Méthanol
MI	Marennine interne
MLV	Vésicule multilamellaire (<i>Multilamellar vesicle</i>)
MO	Missouri
mol	mole
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényle terazolium (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl terazolium bromide)
n	Nano
NaCl	Chlorure de sodium (<i>sodium chloride</i>)
NaOH	Hydroxyde de sodium
nb	nombre
NC	Caroline du Nord (<i>North Carolina</i>)
nd	non disponible
NH ₄ HCO ₃	Carbonate d'ammonium
NL	Lipide neutre (<i>neutral lipid</i>)
NSERC	<i>Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada</i>

OD ₆₀₀	Densité optique à 600nm (<i>optical density at 600nm</i>)
ON	Ontario
³¹ P	Isotope de masse 31 du phosphore
P _d	Pourcentage de destruction cellulaire
P _p	Pourcentage de protection cellulaire
PA	Acide palmitique (<i>palmitic acid</i>)
PAC	Peptide antimicrobien cationique
PA-d ₃₁	Acide palmitique deutéré (<i>deuterated palmitic acid</i>)
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Phosphatidylcholine
PDPC-d ₆₂	1- palmitoyl- 2- docosahexaénoyl- sn- glycéro- 3- phosphocholine deutéré
PE	Phosphatidyl-éthanolamine (<i>phosphatidylethanolamine</i>)
PG	phosphatidyl-glycérol (phosphatidylglycerol)
pH	Potentiel hydrogène
Ph.D.	Docteur <i>philosophiae</i>
PL	Lipide polaire (<i>polar lipid</i>)
PL _t	Phospholipides totaux
POPC-d ₃₁	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine deutéré
PS	Phosphatidylsérine
PxB	Polymyxine B (<i>polymyxin B</i>)
QC	Québec
r	Distance internucléaire
R ²	Coefficient de détermination

RAQ	Réseau Aquaculture Québec
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN-ÉS	Résonance magnétique nucléaire de l'état solide
RT	Température de la pièce (<i>room temperature</i>)
S_{C^2H}	Paramètre d'ordre du lien carbone deutérium (<i>order parameter of the carbon deuterium bond</i>)
SRI	Service des Relations Internationales de l'UQÀM
SS-NMR	<i>Solid state nuclear magnetic resonance</i>
S/U	Saturé/insaturé (<i>saturated/unsaturated</i>)
T ₁	Relaxation longitudinale
T ₂	Relaxation transverse
T _m	Température de transition de phase gel-liquide cristalline (<i>melting temperature</i>)
TAG	Triglycérides
TDR	Résistant à tous les médicaments (<i>total drug-resistant</i>)
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
USA	<i>United States of America</i>
UV-VIS	Ultraviolet-visible
UQÀM	Université du Québec à Montréal
UQÀR	Université du Québec à Rimouski
w	<i>weight</i>
z	Charge
γ	Rapport gyromagnétique
γ_D	Rapport gyromagnétique du deutérium

Δ_2	Distribution des éclatements quadripolaires (<i>distribution of quadripolar splittings</i>)
ΔE	Différence d'énergie
$\Delta \nu_Q$	Éclatement quadripolaire (mesuré en kHz)
η	Tenseur
μ	Grandeur micro
$\bar{\mu}$	Moment magnétique
ν	Fréquence
τ	Délai
ω	fréquence angulaire (<i>angular frequency</i>)
ω_0	fréquence angulaire de Larmor (<i>Larmor angular frequency</i>)

LISTE DES UNITÉS

Å	Unité de distance (Ångström)
bar	Unité de pression (bar)
°C	Unité de température (degré Celsius)
Da	Unité de masse volumique (dalton)
g	Unité de masse (gramme)
G	Unité d'accélération (accélération due à la pesanteur, <i>gravitational</i>)
h	Unité de temps (heure)
Hz	Unité de fréquence (hertz)
L	Unité de volume (litre)
m	Unité de distance (mètre)
M	Unité de concentration (molaire)
mg	Unité de masse (milligramme)
min	Unité de temps (minutes)
mL	Unité de volume (millilitre)
mm	Unité de distance (millimètres)
mS	Unité de conductance (millisiemens)
N	Unité de concentration (normale)
rpm	Unité de fréquence (tours par minute, <i>rotation per minute</i>)
s	Unité de temps (seconde)

T Unité d'induction magnétique (tesla)

W Unité de puissance (watts)

RÉSUMÉ

Le phénomène de résistance aux antibiotiques stimule le développement de nouveaux médicaments. Ceux ayant un mécanisme d'action basé sur la perturbation des membranes bactériennes sont de bons candidats puisque les pathogènes y développent plus lentement une résistance. La RMN-ÉS *in vivo* de membranes naturelles marquées au deutérium (^2H) devraient permettre des études plus représentatives des interactions entre les membranes et des agents antimicrobiens ce qui poussera le développement de nouveaux antibiotiques moins susceptibles aux phénomènes de résistance. Le but de ce projet est donc de préparer des bactéries *Escherichia coli* ayant les lipides membranaires deutérés par incorporation d'acides gras exogènes deutérés pour permettre des études *in vivo* par ^2H RMN-ÉS. Le projet a également pour but d'extraire et purifier des pigments de type marennine pour évaluer leur activité biologique et leurs effets sur les membranes d'*E. coli*. Nos résultats démontrent qu'une souche sauvage d'*E. coli* incorpore l'acide palmitique deutéré dans les phospholipides membranaires à un taux de 76 % (m/m d'acide gras totaux) permettant un bon rapport signal sur bruit sur les spectres ^2H RMN-ÉS. Trois agents antimicrobiens avec des mécanismes d'action différents ont été testés afin de vérifier la réponse des membranes deutérée d'*E. coli*. Les effets de l'antibiotique polymyxine B étaient cohérents avec la rigidification des membranes, tandis que l'exposition aux nanoparticules de fullerénol a restreint légèrement la dynamique des phospholipides. Le spectre du chlorure de cétyltriméthylammonium révèle la formation d'une phase gel de la membrane. Les interactions entre le modèle développé et les agents antimicrobiens sont en accord avec les mécanismes d'action connus ce qui souligne la justesse de l'analyse *in vivo* ^2H RMN-ÉS d'une souche sauvage d'*E. coli* pour étudier les mécanismes d'action des agents antimicrobiens et les biomembranes. Le modèle développé a été exposé à l'agent antimicrobien marennine pour vérifier si ce pigment algal extrait de diatomées perturbait les membranes d'*E. coli*. Les travaux ont permis d'optimiser la croissance des diatomées *H. provincialis* et d'*H. karadagensis* en réduisant l'intensité lumineuse, ce qui a assuré la qualité et la quantité du pigment marennine. L'analyse ^2H RMN-ÉS indique que la forme externe du pigment extrait d'*H. provincialis* rigidifie les membranes d'*E. coli* tandis que la forme interne les fluidifie légèrement ce qui est en accord avec leurs propriétés antimicrobiennes respectives connues. Les interactions entre les pigments et les membranes bactériennes sont possiblement la cause de leur action antibiotique. Les formes externes d'*H. ostrearia* et d'*H. karadagensis* ont été testées sur les cellules Vero pour déterminer leur cytotoxicité et leur effet antiviral sur le virus HSV-1. Le pigment d'*H. karadagensis* est moins toxique et a un effet antiviral plus important que le pigment d'*H. ostrearia* ce qui oriente la recherche de nouveaux agents antiviraux sur les pigments d'*H. karadagensis*.

Mots clés : Bactérie Gram négatif, interactions membranaires, polymyxine B, fullerène polyhydroxylé, chlorure de cétyltriméthylammonium, pigment de type marennine.

INTRODUCTION

Le début du 20^e siècle fut révolutionnaire dans le domaine de la médecine grâce à l'introduction des antibiotiques pour soigner les infections, ce qui a permis de sauver d'innombrables vies. Malgré leur utilisation rapidement devenue fréquente, les maladies infectieuses n'ont pas pu être éliminées. De plus, le mauvais usage des antibiotiques a propulsé le phénomène de résistance. En effet, les pathogènes ont su s'adapter aux antibiotiques, créant ainsi des souches résistantes. Pour guérir les infections causées par les pathogènes résistants, de nouveaux antibiotiques ont donc été développés. Malheureusement, les pathogènes ont su également s'adapter à ces derniers, causant l'apparition de souches résistantes à plusieurs antibiotiques qui compliquent le traitement des patients et ont contribué à augmenter le taux de mortalité. Ainsi, la propagation de pathogènes multirésistants est mondialement considérée comme une problématique prioritaire (Woodford, Turton et Livermore, 2011).

Il semble difficile de briser ce cercle vicieux car les pathogènes semblent toujours s'adapter aux nouveaux antibiotiques développés. Cependant, l'usage approprié d'antibiotiques moins sujets au phénomène de résistance devrait ralentir l'apparition de nouvelles résistances. Ainsi, beaucoup d'efforts sont consacrés au développement d'antibiotiques ayant des mécanismes d'action innovateurs.

Les antibiotiques développés à ce jour ont différents modes d'action. Ils peuvent inhiber des processus biologiques vitaux comme la synthèse du peptidoglycane essentiel à la formation des parois cellulaires, celle des acides gras essentiels à la formation des membranes, ou celle des protéines et de l'ADN à divers niveaux (Davies et Davies, 2010). Une récente stratégie pour le développement de nouveaux antibiotiques a émergé de l'observation d'un phénomène naturel, soit la perturbation des membranes bactériennes par les peptides antimicrobiens.

Les peptides antimicrobiens font partie du système immunitaire de plusieurs organismes, dont les microbes, les insectes, les plantes, les invertébrés et les vertébrés. Ils interagissent de façon non spécifique avec les membranes bactériennes et affectent leur organisation (Gehman *et al.*, 2008 ; Ramamoorthy *et al.*, 2006). Les membranes sont des barrières sélectives qui protègent les cellules des agents externes toxiques, permettent aux éléments nutritifs de pénétrer dans le cytoplasme et régularisent la fonctionnalité des protéines inter-membranaires. Leur perturbation par des peptides antimicrobiens empêche l'accomplissement des fonctions membranaires vitales pour le pathogène.

La perturbation des membranes est un mécanisme d'action de plus en plus ciblé pour le développement de nouveaux antimicrobiens puisqu'il est moins sujet aux phénomènes de résistance (Epanand et Epanand, 2011). La conception de nouveaux antibiotiques efficaces nécessite donc une compréhension du mécanisme d'action d'agents antibactériens ciblant les membranes des pathogènes. Dans le cas des peptides antimicrobiens cationiques, ces interactions seraient a priori de nature électrostatique. Les peptides antimicrobiens chargés positivement seraient attirés par les charges négatives des lipides anioniques qui composent partiellement les membranes des bactéries. Ainsi, ce serait la nature amphiphile des peptides antimicrobiens qui serait responsable de la formation de pores dans la bicouche lipidique ou de la solubilisation partielle des lipides membranaires par des concentrations locales élevées en peptides antimicrobiens.

Plusieurs techniques ont été employées pour étudier les interactions entre les agents antimicrobiens et les membranes bactériennes comme la modélisation moléculaire, la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire. L'utilisation de modèles pour mimer les membranes bactériennes a permis de grandes avancées telles que l'identification de divers modes d'action pour les peptides antimicrobiens naturels. Ainsi, de nouveaux peptides antimicrobiens artificiels aux propriétés améliorées ont pu être élaborés. Par contre, les membranes modèles composées de quelques types de lipides assemblés sous forme de bicelles ou de vésicules multilamellaires sont peu représentatives de la complexité des membranes naturelles des pathogènes. Ainsi, certaines interactions entre les membranes naturelles et les agents antimicrobiens ne sont possiblement pas observables avec les membranes modèles qui ne contiennent pas, par exemple de lipopolysaccharides. Les

avancements dans le développement de nouveaux antibiotiques perturbant les membranes bactériennes pourraient donc être limitées par la représentativité des modèles membranaires, ce qui peut être surmonté par des études *in vivo*.

Le premier objectif de ce projet était donc de développer une méthode permettant l'étude *in vivo* des interactions entre divers agents antimicrobiens et les membranes cellulaires d'un pathogène. La robustesse de la technique a été évaluée à l'aide d'agents antimicrobiens aux effets connus sur la membrane bactérienne. Le second objectif visait à isoler un pigment bleu à effet antimicrobien produit par les diatomées, la marennine – et à étudier son interaction avec les membranes bactériennes dans le but de proposer une nouvelle molécule pour contrer le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques.

La résonance magnétique nucléaire de l'état solide du noyau deutérium (^2H RMN-ÉS) est une technique efficace pour étudier la perturbation des bicouches de phospholipides causée par les interactions avec des agents actifs. C'est une technique non invasive qui sonde la perturbation de la dynamique des chaînes acyles au cœur des membranes (Seelig et Macdonald, 1987). Beaucoup d'informations ont été tirées d'études portant sur des membranes modèles composées de phospholipides ayant des chaînes lipidiques deutérées en présence de divers agents antimicrobiens. De récentes avancées permettent maintenant des études similaires, mais *in vivo* sur la bactérie *Escherichia coli*. Elles présentent le défi de deutérer spécifiquement les membranes bactériennes et de maintenir les microorganismes en vie lors de l'analyse.

Il a été démontré qu'il est possible d'intégrer, par diffusion, des lipides deutérés dans les membranes de cellules déjà formées, mais cette méthode augmente la quantité de lipides dans les membranes bactériennes. De plus, l'utilisation d'organismes ayant des membranes mutées est nécessaire pour obtenir un taux de marquage significatif pour une analyse ^2H RMN-ÉS, ce qui diminue la représentativité de ces modèles. Le métabolisme des lipides de la bactérie *E. coli* est connu et a permis de développer une autre stratégie de marquage. En effet, des lipides deutérés exogènes peuvent être incorporés dans les phospholipides naturels des bactéries pendant leur croissance en utilisant la machinerie cellulaire. Ceci a été possible à l'aide de mutants d'*E. coli* (souches L51 et LA8) auxotrophes en acides gras exogènes et déficiente en dégradation d'acides gras (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012).

Ainsi, leur croissance en présence d'acides gras deutérés résulte en la deutération des phospholipides membranaires par incorporation lors de leur biosynthèse. L'utilisation de ces souches de bactéries mutées limite leur accessibilité et, donc, la faisabilité des études ^2H RMN-ÉS *in vivo* sur les membranes d'*E. coli*. Pourtant, il est bien connu qu'*E. coli* sauvage a la capacité d'incorporer des acides gras exogènes de 12 carbones et plus dans les phospholipides membranaires. Ainsi, les modifications génétiques ne sont a priori pas nécessaires pour marquer *E. coli*.

Dans ce projet, les membranes d'une souche sauvage d'*E. coli* ont été marquées par incorporation d'acides gras deutérés exogènes en faisant croître les cellules dans un milieu de culture contenant de l'acide palmitique deutéré micellisé à l'aide de dodécylphosphocholine. Les bactéries ont été rincées puis exposées sous forme de culot à des agents antimicrobiens. La vitalité cellulaire des échantillons a été évaluée suite à leur analyse ^2H RMN-ÉS pour déterminer si cette technique pouvait être réalisée *in vivo*. Trois agents antimicrobiens d'effets différents et connus ont été testés pour valider la sensibilité et la justesse du modèle développé : le lipopeptide polymyxine B (PxB), les nanoparticules de fullerol et le détergent cationique chlorure de cétyltriméthylammonium (CTAC). Une fois la robustesse de la méthode assurée, différents pigments du genre marennine extraits de diatomées ont été testés dans le but de vérifier leur pertinence dans le développement de nouveaux antibiotiques moins susceptibles au phénomène de résistance.

Le document suivant est divisé en plusieurs sections. Le premier chapitre est une présentation plus approfondie de la problématique de résistance aux médicaments discutée précédemment et de la pertinence de la méthode de RMN *in vivo* développée sur des *E. coli* sauvages. Dans le chapitre 2, les notions théoriques essentielles aux différents aspects du projet sont élaborées. Le principe de l'analyse par ^2H RMN-ÉS de biomembranes et la biosynthèse des phospholipides chez *E. coli* y sont traités. De plus, les étapes conduisant à l'obtention d'un profil lipidique y sont expliquées, de même que le principe de la détermination de la viabilité cellulaire par réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényle terazolium (MTT). Le chapitre 3 constitue un article scientifique soumis pour publication dans la revue scientifique *BBA-Biomembranes* traitant de l'étude *in vivo* des membranes d'*E. coli* par ^2H RMN-ÉS en présence d'agents antimicrobiens d'effets connus.

La production et la récupération du pigment marennine, ainsi que ses effets biologiques sont étudiés dans le chapitre 4. Finalement, ce document est conclu par un bilan du travail effectué dans cette étude et propose quelques perspectives futures.

CHAPITRE I

PROBLÉMATIQUE

1.1 Résistance aux antibiotiques

Le succès d'un agent thérapeutique est compromis par le développement potentiel de résistance (Davies et Davies, 2010). Les exemples les plus frappants en termes de mortalité concernent les bactéries. Vers la fin du 19^e siècle, ces agents infectieux furent découverts, ce qui a stimulé la recherche pour prévenir les infections. Une cinquantaine d'années plus tard, les antibiotiques furent introduits en médecine, permettant de sauver d'innombrable vie. Malheureusement, l'usage des antibiotiques a causé l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques courants.

La pénicilline, qui fut découverte par Alexander Fleming en 1928, fait partie de la classe des antibiotiques β -lactames. Cet antibiotique affecte la biosynthèse du peptidoglycane, ce qui compromet l'intégrité des parois cellulaires bactériennes. Dans les années 1940, seulement quelques années après son introduction comme agent thérapeutique, des souches bactériennes résistantes furent identifiées. Ces dernières avaient développé la capacité de synthétiser des enzymes pouvant dégrader la pénicilline, les pénicillinases (Davies et Davies, 2010). Ainsi, plusieurs études démontrent un lien entre l'usage d'agents antibiotiques et l'augmentation de la fréquence d'apparition du phénomène de résistance aux agents pathogènes (Cantón et Morosini, 2011). Au début des années 1950, l'érythromycine a été introduite pour remplacer la pénicilline dans le traitement d'infections causées par *S. aureus* à l'hôpital de Boston (Davies et Davies, 2010). L'usage de cet antibiotique cessa moins d'un an après le début de son utilisation suite à la découverte de la résistance à l'érythromycine par 70 % des souches de *S. aureus* isolées à l'hôpital. Ainsi, l'exposition aux

antibiotiques est le facteur le plus important pour l'apparition de résistance et leur étendue (Cantón et Morosini, 2011).

Depuis l'apparition des antibiotiques il y a 70 ans, l'amélioration de leur production a permis de réduire leur coût et ainsi, d'augmenter leur utilisation dans plusieurs domaines. Ainsi, des millions de tonnes d'antibiotiques ont été rejetées dans l'environnement, ce qui entretient les souches résistantes (Davies et Davies, 2010). L'usage intensif d'antibiotiques dans les hôpitaux fait de ce milieu un endroit particulièrement propice pour le développement de souches bactériennes résistantes. Des infections très sérieuses peuvent être contractées à l'hôpital (infections nosocomiales) à partir de souches résistantes de bactéries comme *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* et *Haemophilus influenza* pour en nommer seulement quelques-unes (Davies et Davies, 2010). Les bactéries peuvent être également résistantes à plusieurs antibiotiques (MDR, *multidrug-resistant*), ce qui retarde l'administration du bon traitement et réduit les options adéquates. *M. tuberculosis* est la bactérie responsable de la tuberculose, une infection des voies respiratoires ayant causé de nombreuses épidémies chez l'humain. L'apparition de souches MDR dans les régions industrialisées et en développement depuis la dernière décennie a fait de la tuberculose causée par *M. tuberculosis* MDR une maladie difficilement traitable actuellement. De plus, des souches de *M. tuberculosis* résistantes à tous les antibiotiques ont été découvertes (TDR, *total drug-resistance*) (Davies et Davies, 2010). En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé que 440 000 nouveaux cas de tuberculose MDR ont été contractés durant l'année, ce qui représente 3,6 % des cas de tuberculose (Organisation Mondiale de la Santé, 2012). Ceci est particulièrement inquiétant sachant que le taux de succès des traitements contre la tuberculose MDR est de seulement 61 % et que 10 % des patients en meurent. De plus, le traitement de tuberculose MDR est jusqu'à 4 fois plus long et 100 fois plus dispendieux que la tuberculose pharmacosensible et également plus toxique pour les patients (Organisation Mondiale de la Santé, 2012). Ainsi, la propagation de pathogènes multirésistants augmente le taux de mortalité et les coûts des traitements, et est donc considérée une problématique mondiale prioritaire (Woodford, Turton et Livermore, 2011). De nouveaux antibiotiques sont requis pour combattre les pathogènes résistants, mais pour éviter de simplement pallier à ce problème, le développement de nouveaux antibiotiques pourrait aussi prévenir ou retarder le

phénomène de résistance en ayant des mécanismes plus difficilement surmontables par les pathogènes.

1.2 Modes d'action des antibiotiques courants

À ce jour, plusieurs cibles ont été identifiées chez les bactéries pour la création d'antibiotiques. Ces dernières sont illustrées à la figure 1.1 pour les principales classes d'antibiotiques. Les antibiotiques développés peuvent cibler la formation des parois cellulaires en affectant la synthèse du peptidoglycane, la membrane cellulaire en perturbant la bicouche de phospholipides ou la biosynthèse des acides gras et des protéines en les inhibant. La synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est également ciblée en inhibant la synthèse de l'acide folique (Iliades, Meshnick et Macreadie, 2005). Finalement, les mécanismes de translation et de transcription de l'acide ribonucléique (ARN) ainsi que la réplication de l'ADN et de l'ARN peuvent être inhibés par les antibiotiques courants. Toutefois, les bactéries ont développé des résistances à toutes les classes d'antibiotiques ciblant les procédés biologiques énumérés ci-haut.

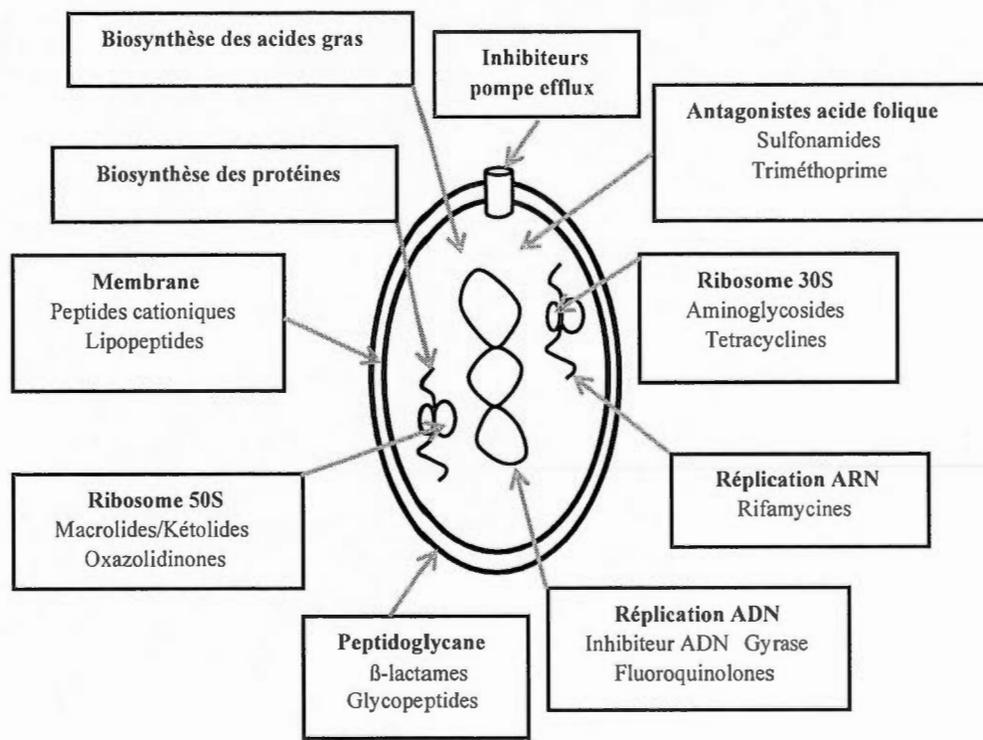


Figure 1.1 Illustration des principales cibles des classes d'antibiotiques les plus communs. Quelques exemples d'antibiotiques sont donnés. Adaptée de Bush et Pucci, 2011.

1.3 Phénomène de résistance chez les bactéries

Le tableau 1.1 résume les principaux modes de résistance développés chez les pathogènes pour les principales classes d'antibiotiques utilisés. La stratégie employée par les pathogènes contre toutes les classes d'antibiotiques est l'altération de la cible. Par exemple, les bactéries peuvent modifier leur membrane pour minimiser la perturbation de cette dernière par les antibiotiques. En modifiant leurs phospholipides ou le lipide A, les pathogènes changent leur charge de surface à positive afin de repousser un antibiotique cationique (Koprivnjak et Peschel, 2011). Un autre mécanisme de résistance très courant est l'excrétion efficace de l'antibiotique par le système d'efflux cellulaire de façon à minimiser les concentrations intracellulaires et ainsi, l'effet antibiotique. Le nombre de modes de résistance développés varie d'une classe d'antibiotiques à une autre, et certains types de résistances sont beaucoup plus rares que d'autres. Ainsi, certaines cibles sont plus sensibles

au phénomène de résistance orientant la recherche vers les classes d'antibiotiques moins enclin au phénomène de résistance.

Tableau 1.1 Mode de résistance des pathogènes aux principales classes d'antibiotiques. Adapté de Davies et Davies, 2010.

Classes d'antibiotiques	Exemples	Cibles	Modes de résistance
β -lactames	pénicillines céphalosporines monobactames	biosynthèse peptidoglycane	hydrolyse, efflux, cible altérée
glycopeptides	vancomycine teicoplanine	biosynthèse peptidoglycane	reprogrammation biosynthèse peptidoglycane
aminoglycosides	gentamicine streptomycine spectinomycine	traduction	phosphorylation, acétylation, nucléotidylation, efflux, cible altérée
tétracyclines	minocycline tigécycline	traduction	monooxygénation, efflux, cible altérée
macrolides	érythromycine azithromicine	traduction	hydrolyse, glycosylation, phosphorylation, efflux, cible altérée
lincosamides	clindamycine	traduction	nucléotidylation, efflux, cible altérée
streptogramines	synercid	traduction	C-O lyase, acétylation, efflux, cible altérée
oxazolidinones	linezolid	traduction	efflux, cible altérée
phénicol	chloramphénicol	traduction	acétylation, efflux, cible altérée
quinolones	ciprofloxacine	réplication ADN	acétylation, efflux, cible altérée
pyrimidimes	triméthoprim	synthèse ADN	efflux, cible altérée
sulfonamides	sulfaméthoxazole	synthèse ADN	efflux, cible altérée
rifamycines	rifampine	transcription	ribosylation, efflux, cible altérée
lipopeptides	daptomycine polymyxine	membrane cellulaire	cible altérée
peptides cationiques	colistine	membrane cellulaire	cible altérée, efflux

1.4 Développement de nouveaux antibiotiques

La perturbation des membranes est un mécanisme d'action de plus en plus ciblé pour le développement de nouveaux antibiotiques puisqu'il est moins susceptible aux phénomènes de résistance (Epanand et Epanand, 2011). C'est le cas des peptides et des lipopeptides antimicrobiens qui interagissent avec les membranes bactériennes et perturbent leur organisation (Arouri, Dathe et Blume, 2009). Les peptides antimicrobiens font partie du système immunitaire de plusieurs organismes, dont les microbes, les insectes, les plantes, les vertébrés et les mammifères, et plusieurs centaines ont été caractérisées à ce jour (Gehman *et al.*, 2008 ; Ramamoorthy *et al.*, 2006). Ils peuvent être linéaires ou cycliques, mais une grande partie sont cationiques. Les peptides antimicrobiens cationiques (PAC) présentent un caractère amphiphile. Ces peptides sont chargés positivement dû à la présence d'acides aminés comme la lysine et l'arginine et ils contiennent un pourcentage élevé d'acides aminés hydrophobes (Balla, Bowie et Separovic, 2004). Les plus abondants et les plus étudiés sont les peptides linéaires formant des hélices- α de courte taille (< 40 résidus) et amphiphiles (Gehman *et al.*, 2008). Les PAC de type magainines extraits des sécrétions de la grenouille africaine *Xenopus laevis* en est un exemple. La clé des mécanismes d'action des PAC peu sensibles au phénomène de résistance est que contrairement aux autres antibiotiques, ils n'ont pas de cible précise mais demeurent sélectifs aux membranes bactériennes plus tôt qu'aux membranes des cellules de l'hôte. Ainsi, ils tuent les pathogènes en perméabilisant leurs membranes suite à plusieurs interactions peptides-membranes et en atteignant d'autres cibles à l'intérieur des cellules (Jenssen, Hamill et Hancock, 2006).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets de différents PAC sur les membranes bactériennes. Les peptides non structurés illustrés à la figure 1.2 (a) se lient à la bicouche lipidique par interactions électrostatiques entre les acides aminés chargés positivement des peptides et des composés chargés négativement situés dans l'enveloppe externe des membranes bactériennes comme les groupements phosphate des lipopolysaccharides où les lipides anioniques pour les bactéries à Gram négatif, et l'acide lipoteicoïc pour les bactéries à Gram positif (Jenssen, Hamill et Hancock, 2006). Les peptides adoptent alors une forme d'hélice et une position plus ou moins horizontale sur la bicouche

sans la perturber tel illustré à la figure 1.2(b) et (c) (Jenssen, Hamill et Hancock, 2006). Cette adhésion électrostatique est à la base de la sélectivité des PAC pour les membranes bactériennes plutôt que les membranes eukaryotes qui sont composés principalement de lipides neutres (Jenssen, Hamill et Hancock, 2006). Un premier mécanisme d'action est la perturbation de la membrane par perméabilisation augmentant les échanges d'ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule suite à la formation de pores (Ramamoorthy *et al.*, 2006). Des pores transmembranaires de différentes structures se forment comme les pores de type barillet (figure 1.2(d)) et de type toroïdal (figure 1.2(e)). Un deuxième mécanisme d'action est la solubilisation des membranes selon un mécanisme tapis illustré à la figure 1.2 (f) grâce aux propriétés amphiphiles de certains PAC similaires aux détergents. Lorsque la concentration locale est assez élevée, la membrane peut être micellisée créant des trous (Jenssen, Hamill et Hancock, 2006). Un troisième mécanisme d'action est la séparation de phases dans la membrane créant des microdomaines tel qu'illustré à la figure 1.3. C'est le cas du lipopeptide cationique polymyxine B isolé de la bactérie à Gram positif *Bacillus polymyxa* vivant dans le sol (Wiese *et al.*, 1998).

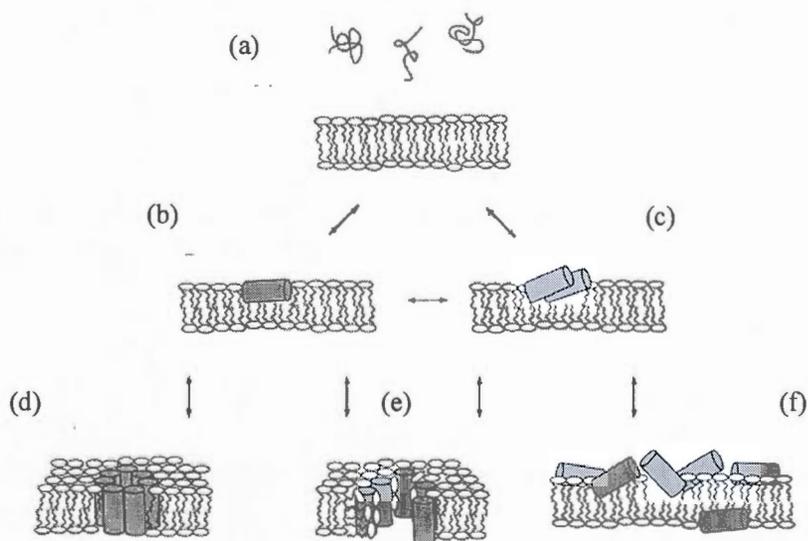


Figure 1.2 Mécanismes d'action des PAC pour perturber les membranes bactériennes. Les peptides non structurés en solution en (a) le lient à la surface de la bicouche en (b) et (c) pour la perturber en formant des pores structurés comme un barillet (d), des pores de type toroïdal (e) ou en solubilisant la membrane selon un mécanisme tapis (f). Adapté de Strandberg et Ulrich, 2004.

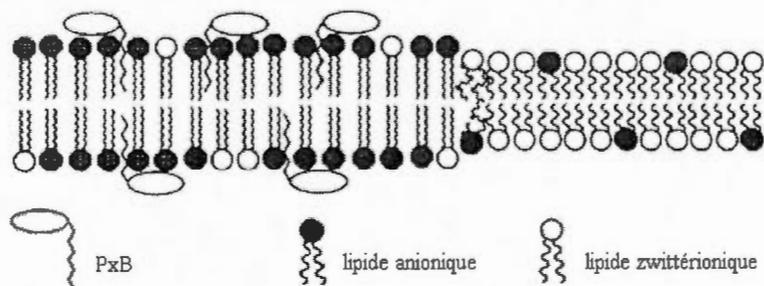


Figure 1.3 Schématisation de la création de domaines de lipides dans une membrane par l'ajout du lipopeptide polymyxine B adaptée de Watts, 1998.

Les bactéries résistantes à ces types de perturbation cellulaires sont très rares. Certaines stratégies adoptées pour résister aux PAC sont l'inactivation ou le clivage du PAC par des protéines ligantes ou des protéases, la répulsion des PAC par modification de la charge à la surface du pathogène, l'altération de la fluidité de la membrane et l'expulsion du peptide en utilisant les pompes d'efflux (Koprivnjak et Peschel, 2011). Ainsi, la recherche de nouveaux antibiotiques basés sur l'amélioration des PAC naturels est prometteuse dû à leurs mécanismes d'action peu susceptibles au phénomène de résistance. Par contre, ces composés présentent plusieurs désavantages par rapport à leur pharmacocinétique, leur administration et leur toxicité ce qui limite leur usage pour l'instant (Bush et Pucci, 2011). Par exemple, la PxB et la bacitracine sont actuellement utilisées de façon topique dans le Polysporin[®], car elles seraient dégradées par les peptidases si elles étaient ingérées (Johnson & Johnson Inc., 2012). Il est donc pertinent de poursuivre la recherche d'autres antibiotiques perturbateurs de membrane qui ne présenteraient pas les faiblesses des PAC.

1.5 Le pigment bleu marennine

La marennine est un pigment bleu produit par la diatomée *Haslea ostrearia*. La structure exacte du pigment est encore inconnue à ce jour, mais est semblable aux polyphénols (Pouvreau *et al.*, 2006a). Certains polyphénols sont reconnus pour interagir spécifiquement avec la surface des membranes en les abimant, expliquant leurs propriétés antimicrobiennes (Nakayama, Kaiya et Kumazawa, 2006). Ainsi, les propriétés antimicrobiennes de la marennine pourraient découler de son interaction avec les membranes

cellulaires bactériennes. Dans cette éventualité, les nouveaux antibiotiques issus de ce pigment seraient possiblement encore moins susceptibles aux phénomènes de résistance que les PAC car ils ne seraient pas affectés par les peptidases des pathogènes et/ou de l'organisme infecté.

De façon générale, la conception de nouveaux antibiotiques efficaces nécessite une compréhension du mécanisme d'action d'agents antimicrobiens ciblant les membranes (Arouri, Dathe et Blume, 2009). Ceci débute par la compréhension des fonctions et de la structure des membranes pathogènes elles-mêmes.

1.6 Bactéries et membranes cellulaires

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif dont certaines souches pathogènes sont responsables de plusieurs types d'infections intra- et extra-intestinales (Bélangier *et al.*, 2011). Les membranes d'*E. coli* sont étudiées depuis longtemps puisque cet organisme est facile à croître, génétiquement manipulable et son génome a été séquencé, donc connu (Dowhan et Bogdanov, 2002).

Malgré la simplicité des bactéries par rapport aux organismes pluricellulaires, leurs membranes cellulaires demeurent très complexes. Elles sont un assemblage macromoléculaire de lipides amphiphiles -les phospholipides- créant une bicouche lipidique d'une épaisseur de 30Å, avec un coeur apolaire (Dowhan et Bogdanov, 2002). Tel qu'illustré à la figure 1.4, les membranes cellulaires des bactéries de Gram négatif comme *E. coli* sont composées de deux bicouches de phospholipides, soient les membranes interne et externe. L'espace entre les deux membranes est le périplasme où se trouve le peptidoglycane. Le feuillet externe de la membrane externe est entre autres composé du lipide A attaché à un lipopolysaccharide (LPS). Des protéines sont associées aux bicouches lipidiques, telles les porines qui sont des protéines transmembranaires (Dowhan et Bogdanov, 2002).

Les membranes ont plusieurs fonctions. L'une d'elles est la compartimentation de la cellule et de ses composantes subcellulaires, les organelles (Dowhan et Bogdanov, 2002). Elles sont aussi une barrière sélective qui protège l'organisme des agents externes toxiques et permet aux éléments nutritifs de pénétrer dans la cellule. De façon générale, la membrane sert également de support pour divers processus intramembranaires et également en périphérie.

Leur intégrité est vitale pour les pathogènes, ce qui en fait une excellente cible pour les antibiotiques.

Dans le cas d'un organisme simple comme la bactérie *E. coli*, trois principaux types de tête polaires composent les phospholipides, soit la phosphatidyl-éthanolamine (PE) qui compte pour 70 % des phospholipides, le phosphatidyl-glycérol (PG) et la cardiolipine (CL) représentant respectivement 20 % et 10 % des phospholipides. Les phospholipides chargés négativement sont la cible des PAC par interactions électrostatiques avec les acides aminés chargés positivement, ce qui perturbe les membranes bactériennes (Balla, Bowie et Separovic, 2004). L'étude des interactions avec les membranes cellulaires est donc nécessaire pour comprendre les mécanismes d'action des antibiotiques et propulser le développement de nouveaux antibiotiques prometteurs.

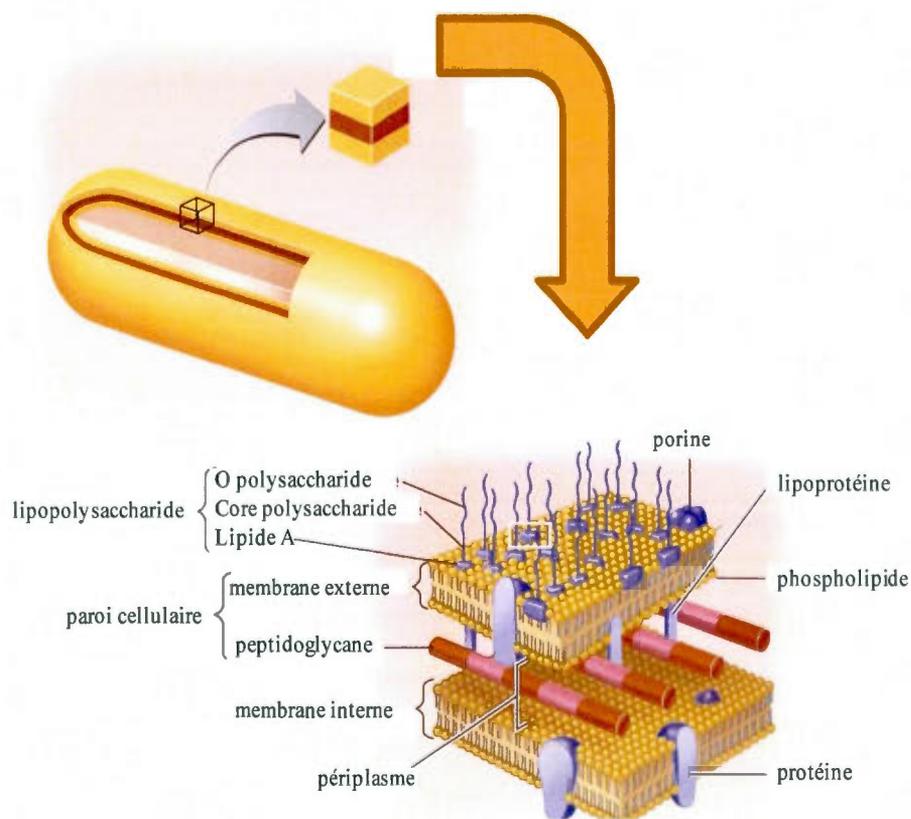


Figure 1.4 Schématisation des membranes de bactéries à Gram négatif. Adapté de Anonyme, 2010.

1.7 RMN et étude des membranes cellulaires

Plusieurs techniques ont été développées pour étudier les interactions entre les antibiotiques et les membranes cellulaires. La résonance magnétique nucléaire de l'état solide du noyau deutérium (^2H RMN-ÉS) est un outil efficace pour étudier la perturbation des bicouches de phospholipides causée par les interactions avec des agents actifs. C'est une technique non invasive qui sonde la perturbation de la dynamique et de l'organisation des chaînes acyle au cœur des membranes (Seelig et Macdonald, 1987). Beaucoup d'informations ont été tirées d'études portant sur des membranes modèles composées de phospholipides ayant des chaînes lipidiques deutérées, organisés en vésicules multilamellaires (MLV, *multilamellar vesicles*), en bicelles ou en bicouches supportées mécaniquement en présence de divers agents antimicrobiens (Balla, Bowie et Separovic, 2004 ; Oreopoulos *et al.*, 2010). C'est ainsi que la ^2H RMN-ÉS a aidé à suggérer les divers mécanismes énumérés ci-haut pour l'interaction des PAC avec les membranes. Par exemple, les peptides antimicrobiens auréine 1.2, citropine 1.1 et maculatine 1.1 sécrétés par les glandes dorsales de différentes espèces de grenouilles australiennes semblent avoir une interaction plutôt en périphérie de la membrane ce qui suggère un mécanisme d'action semblable aux détergents (Balla, Bowie et Separovic, 2004).

Par contre, il peut être difficile d'appliquer ces observations aux phénomènes naturels de perturbation de membranes bactériennes puisque ces dernières sont très complexes par rapport aux modèles développés. *E. coli* est une cellule simple comparativement aux autres organismes. Quelques types d'acides gras se rattachent aux trois principales têtes polaires résultants en non moins qu'une centaine de phospholipides différents. Chez les organismes plus complexes comme les eucaryotes, des milliers de types de lipides composent leurs membranes (Dowhan et Bogdanov, 2002). Comme les membranes artificielles ont une composition limitée et qu'elles n'incluent pas de constituants naturels comme les LPS de la membrane externe d'*E. coli*, les études sur les cellules entières et vivantes devraient mieux rendre compte des interactions entre les membranes naturelles et les agents antimicrobiens que les études faites sur les bicouches artificielles. Par contre, elles présentent le défi de deutérer spécifiquement les membranes bactériennes et de maintenir les microorganismes en vie.

1.8 Marquage des membranes

En RMN-ÉS d'échantillons complexes comme des cellules entières, le marquage spécifique des membranes est essentiel pour que le spectre obtenu corresponde seulement à la réponse de la membrane et non à d'autres constituants cellulaires. Les membranes sont sondées en y incorporant des lipides exogènes deutérés à des concentrations suffisamment élevées pour obtenir un bon rapport signal sur bruit lors de l'analyse. Les stratégies pour incorporer des lipides exogènes aux membranes cellulaires se divisent en deux groupes et chacune présente des avantages et des inconvénients. Le marquage passif se fait selon différents mécanismes comme la diffusion, la fusion ou l'échange entre les lipides exogènes et les lipides membranaires. Le marquage actif utilise la machinerie cellulaire pour incorporer les composants exogènes des phospholipides à la biosynthèse de ces derniers, ce qui introduit des lipides marqués aux membranes cellulaires. Ceci est possible à partir entre autres d'acides gras exogènes, de glycérol ou de phosphoglycérol.

1.8.1 Marquage passif

La diffusion est un mécanisme passif où des molécules exogènes s'ajoutent aux phospholipides membranaires suite à leur déplacement de façon aléatoire. Ce mécanisme est illustré à la figure 1.5(a) où des lipides exogènes sont ajoutés aux lipides membranaires déjà existants. Il est normalement impossible de faire diffuser des phospholipides dans les membranes d'*E. coli* puisque leur membrane externe est imperméable (Dowhan et Bogdanov, 2002). Par contre, en utilisant un mutant *deep rough* ayant des lipopolysaccharides (LPS) altérés (chaînes plus courtes), l'encombrement de la membrane externe bactérienne est réduit et 4 % de dicaproyl-phosphatidyléthanolamine (di-6:0 PE) et de dicaproyl-phosphatidylsérine (di-6:0 PS) peuvent être ajoutés (Kol *et al.*, 2004).

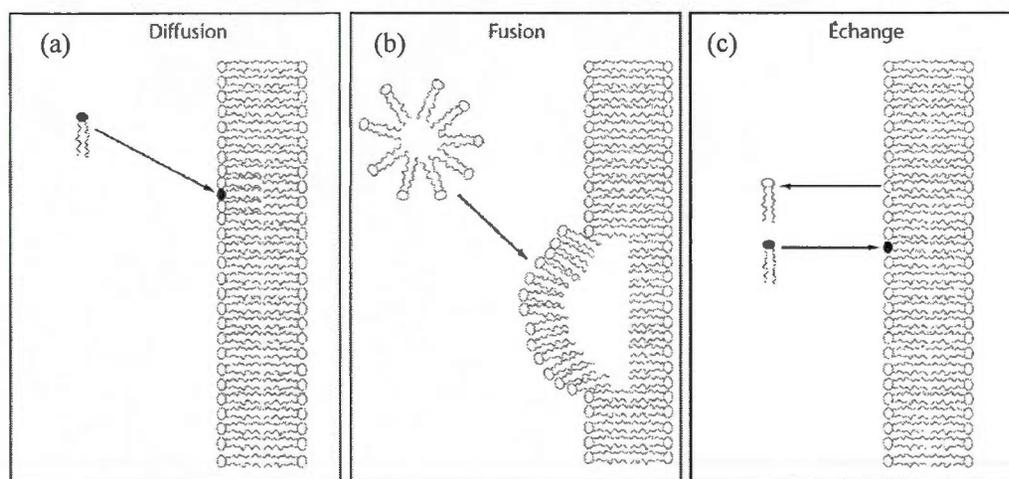


Figure 1.5 Différents mécanismes passifs d'incorporation de lipides exogènes dans des bicouches. Adapté de Dowhan et Bogdanov, 2002.

Une autre technique de marquage passif est la fusion de vésicules lipidiques avec les membranes cellulaires telle qu'illustrée à la figure 1.5(b). C'est le mécanisme qui permet l'incorporation de phospholipides, d'acides gras et du cholestérol radioactifs (^{14}C , ^{32}P) dans les membranes d'une souche sauvage d'*E. coli* à des concentrations variant de 5 à 26 nmol/mg de protéine, ce qui équivaut à des concentrations inférieures à 10% (mol de lipides exogènes/mol de phospholipides totaux (PL_T)) (Proulx, Hellion et Mackenzie, 1982). La bactérie à Gram négatif *Salmonella typhimurium* peut également être marquée à des taux d'environ 10 % (mol de lipides exogènes/mol de PL_T) par fusion de vésicules composées de phospholipides radioactifs (^3H) et de phospholipides extraits de ses membranes (Jones et Osborn, 1977b, 1977a).

Le mécanisme hypothétique qui permettrait le marquage de membranes naturelles est l'échange entre les phospholipides membranaires endogènes et les lipides exogènes. La figure 1.5(c) illustre ce phénomène où un équilibre se fait entre l'entrée d'un lipide exogène et la sortie d'un lipide membranaire. Aucun cas de marquage selon ce mécanisme n'a été décrit. Finalement, on a montré que de 3 à 10% de phospholipides deutérés 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC- d_{31}) et 1-palmitoyl-2-docosahexaénoyl-sn-lycéro-3-phosphocholine (PDPC- d_{62}) peuvent être ajoutés aux membranes des spermatozoïdes d'oursin de mer en incubant des vésicules multilamellaires avec les cellules pendant 30

minutes, mais le mécanisme d'incorporation n'est pas connu (Garnier-Lhomme *et al.*, 2007). Ainsi, l'incorporation de phospholipides entiers par marquage passif est possible, mais difficilement supérieur à 10%. Le marquage actif permet d'atteindre des taux de deutération plus intéressants pour l'analyse ^2H RMN-ÉS.

1.8.2 Marquage actif

En effet, plusieurs organismes ont la capacité d'incorporer des acides gras exogènes à leur biosynthèse de phospholipides. C'est le cas des bactéries à Gram positif, négatif et celles de la famille *Acholeplasma* qui ne possèdent pas de paroi cellulaire. Des cellules eucaryotes comme des myocytes de rat semblent même incorporer une petite quantité d'acides gras polyinsaturés, l'acide icosapentaénoïque hydrogéné (EPA) (Hallaq *et al.*, 1990).

Pour les bactéries à Gram positif, celles des genres *stretococci*, *pneumococci*, *enterococci*, *staphylococci* ont survécu à la présence d'un agent antimicrobien inhibant la synthèse des acides gras, soit le cérulénine ou le triclosan, en incorporant des acides gras exogènes hydrogénés du sérum humain (Brinster *et al.*, 2009). *Clostridium butyricum* et *Clostridium beijerinckii* ont, pour leur part, été rendues auxotrophes en acides gras exogènes par l'absence de la vitamine biotine, ce qui empêche la synthèse des acides gras endogènes et favorise l'incorporation de lipides exogènes partiellement deutérés (Johnston *et al.*, 1987). Sans forcer l'incorporation par l'inhibition des étapes clés de la synthèse des phospholipides, *Micrococcus cryophilus* sauvage a la capacité d'incorporer des acides gras exogènes naturellement à sa synthèse de phospholipides à un taux variant de 7 à 20% en utilisant l'acide palmitique radioactif (C16 :0, ^{14}C) (Sanders et Sönnichsen, 2006). Quant à elle, *Clostridium butyricum* incorpore les acides gras exogènes radioactifs (^{14}C) de longues chaînes à des taux de marquage de 8 à 25 % (Goldfine et Bloch, 1961) en fonction de la nature de l'acide gras exogène. *Bacillus cereus*, pour sa part, a montré une incorporation de 21% (m/m) d'acide docosahexaénoïque hydrogéné (DHA) dans ses phospholipides (Watanabe *et al.*, 1994). Ainsi, les bactéries à Gram positif semblent pouvoir incorporer des lipides exogènes à des taux significatifs pour obtenir une réponse lors d'une analyse ^2H RMN-ÉS si les lipides utilisés avaient été deutérés.

Pour les bactéries à Gram négatif, les taux de marquage sont similaires, voire supérieurs. Watanabe *et al.*, 1994 ont montré que *Shewanella sp.* incorpore 18% (m/m

d'acides gras totaux) de DHA hydrogéné dans ses phospholipides. Les phospholipides de *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* et *Escherichia coli* ont été marqués à des taux de 14, 4 et 11% (m/m d'acides gras totaux) respectivement en incorporant l'acide myristique radioactif (C14:0, ^{14}C) (Byers, 1989). C'est cependant l'utilisation de l'acide palmitique radioactif (16:0, ^{14}C) et oléique radioactif (18:1, ^3H) qui résulte en des taux de marquage exceptionnels de 88 et 90% (m/m d'acides gras totaux) respectivement chez une souche sauvage d'*E. coli* (Sinensky, 1971).

Chez les bactéries sans enveloppe cellulaire, les taux de marquage semblent équivalents aux bactéries à Gram positif. Pour la bactérie *Acholeplasma laidlawii*, la croissance en présence de C16:0 (^3H et ^{14}C) et C18:1 (^{14}C) radioactifs résulte en 12% (mol/mol PL_i) d'incorporation aux membranes et peut grimper à 21% en présence de monoacyle monoglucoxydiacylglycérol (Nyström, Wallbrandt et Wieslander, 1992). De plus, ces dernières peuvent être auxotrophes en acide gras saturés de courtes chaînes en présence de l'agent avidine qui se lie à la vitamine biotine, ce qui bloque la synthèse des acides gras endogènes (Cheng *et al.*, 2002).

1.8.3 Marquage actif par utilisation de mutants d'*E. coli*

Certaines équipes de recherches ont perfectionné le marquage des membranes en utilisant des souches mutantes de bactéries auxotrophes en précurseurs de phospholipides. En nourrissant les cellules avec des précurseurs deutérés, les membranes furent ainsi spécifiquement marquées. La biosynthèse des phospholipides et les mécanismes d'incorporation de précurseurs exogènes sont bien étudiés chez la bactérie *E. coli* et seront abordés au Chapitre 2. Les étapes clés de la biosynthèse ainsi que les différents gènes mutés par certaines équipes de recherche de façon à rendre auxotrophe leur mutant d'*E. coli* y sont détaillés.

Ainsi, les travaux de plusieurs chercheurs ont conduit à la fabrication ou à l'isolement de souches d'*E. coli* mutées à différents niveaux dans la biosynthèse des phospholipides, ce qui les conduit à être auxotrophes en l'un des précurseurs des phospholipides et pourrait conduire à des taux de marquage plus élevés qu'en utilisant les souches sauvages. Les souches LA8 et L51 ont été fabriquées pour être auxotrophes en acides gras exogènes puisque la synthèse endogène de ces derniers est inhibée dû à la mutation du gène *accC* qui transcrit

une protéine essentielle à la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, la première étape de l'initiation de la synthèse des acides gras endogènes (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012). De plus, ces souches sont également mutées au niveau du gène *fadE* ce qui empêche la conversion de l'acyl-CoA en trans-énoyle-CoA qui correspond au début du cycle de β -oxydation des acides gras qui conduit à leur dégradation. Ainsi, de hauts taux de marquage spécifiques sont obtenus puisque la bactérie a besoin d'acides gras exogènes pour vivre et elle ne peut les dégrader pour marquer d'autres constituants cellulaires. Les travaux de Davis *et al.*, 1979 ont montré que 50% (m/m d'acides gras totaux) des acides gras de L51 étaient deutérés, plus de 97% des acides gras incorporés étaient dans des lipides cellulaires et 98,8% étaient dans les phospholipides tandis que 1,2% étaient présents sous forme d'acides gras libres.

Une autre stratégie de marquage est l'auxotrophie en acides gras exogènes insaturés. C'est le cas d'une souche isolée d'*E. coli* (L010) (Silbert et Vagelos, 1967). L'enzyme défectueuse est celle transcrite par le gène *fabA* qui convertit le β -hydroxyacyl-ACP en cis-3-énoyle-ACP et trans-2-énoyle-ACP. Le produit cis est allongé en gardant l'insaturation, ce qui crée des acides gras insaturés (Silbert et Vagelos, 1967). Ainsi, la synthèse d'acides gras insaturés est inhibée, expliquant l'auxotrophie de cette souche qui conduit au marquage de 45 % (m/m d'acides gras totaux) de ses acides gras (Silbert, Cohen et Harder, 1972).

Le marquage actif est également possible par incorporation du glycérol deutéré dans les phospholipides d'un mutant d'*E. coli* auxotrophe en glycérol exogène (Yoshiwa, Akutsa et Kyoku, 1988). Cette souche a possiblement le gène *gpsA* défectueux. La protéine transcrite par le gène *GpsA* est une enzyme qui catalyse la réduction du dihydroxyacétone phosphate en glycérol-3-phosphate, qui est un précurseur de la synthèse des phospholipides (Shimizu, Nishiyama et Tokuda, 1997). Ainsi, ce mutant a besoin d'un apport exogène de glycérol pour synthétiser ses phospholipides. Les phospholipides synthétisés par ce mutant sont donc composés du squelette glycérol fourni exogènement, soit le glycérol deutéré. Le marquage est alors spécifique aux membranes de la bactérie. Dans ce cas, le spectre ^2H RMN-ÉS renseigne plutôt sur la perturbation des têtes polaires des phospholipides, ce qui est une information complémentaire à l'information trouvée en étudiant les chaînes lipidiques au cœur des membranes comme c'est le cas pour un marquage par incorporation d'acides gras. Le gène

pslB peut également être muté ce qui conduit à l'auxotrophie en glycérol-phosphate tel que montré avec un mutant d'*E. coli* isolé par Bell (Heath, Jackowski et Rock, 2002).

1.8.4 Avantages et inconvénients des différentes stratégies de marquage

Comme discuté précédemment, beaucoup de stratégies peuvent être utilisées pour créer un modèle cellulaire deutéré analysable par ^2H RMN-ÉS. Le taux de marquage est le critère le plus important. Il doit être suffisamment élevé pour assurer un bon rapport signal sur bruit et, ainsi, obtenir plus de précisions sur les phénomènes membranaires observés sur les cellules entières. Ainsi, les techniques de marquage par diffusion sont moins recommandées puisque de façon générale, en résulte des échantillons moins marqués. De plus, l'utilisation de mutants *deep rough* d'*E. coli* limite l'application de ce modèle aux membranes naturelles car leur membrane modifiée est peu représentative. Cependant, l'avantage des techniques par diffusion est que des cellules en phase de dormance peuvent être marquées, permettant la deutération de plusieurs types de cellules comme des cellules animales (Garnier-Lhomme *et al.*, 2007).

Le marquage actif a l'avantage de former une membrane deutérée plus biologiquement représentative que par diffusion puisqu'aucun lipide supplémentaire n'est ajouté aux membranes après leur formation. La deutération se fait lors de la croissance des organismes par le remplacement des composantes des phospholipides par leur équivalent deutéré. De plus, cette technique est possible sur une grande variété de bactéries, en particulier de souches sauvages qui peuvent incorporer des acides gras exogènes à des taux suffisamment élevés. Cependant, le désavantage d'utiliser des souches sauvages est que la β -oxydation des acides gras n'est pas contrôlée génétiquement, mais seulement expérimentalement en optimisant la concentration d'acides gras exogènes deutérés. Ces derniers pourraient donc être utilisés comme source de carbone pour la construction d'autres constituants cellulaires que des phospholipides. Ainsi, le marquage ne serait pas localisé uniquement aux phospholipides membranaires. Pour assurer un marquage sélectif des phospholipides membranaires à des taux élevés, des bactéries mutantes peuvent être utilisées. Par contre, l'absence de ces cellules mutées sur le commerce limite leur accessibilité et donc la faisabilité d'études par ^2H RMN-ÉS.

1.8.5 Objectifs

L'objectif de ce projet était de marquer, par incorporation d'acides gras deutérés exogènes, les membranes d'une souche sauvage d'*E. coli* afin de réaliser des études d'interactions membranaires *in vivo* par ^2H RMN-ÉS. Trois agents antimicrobiens d'effets différents et connus ont été testés pour valider la sensibilité du modèle développé : le lipopeptide polymyxine B (PxB), les nanoparticules de fullerenol et le détergent cationique chlorure de cétyl triméthylammonium (CTAC). Ces résultats sont présentés au chapitre 3 sous la forme d'un article scientifique. Une fois la robustesse de la méthode assurée, différents pigments du genre marennine extraits de diatomées ont été testés dans le but de vérifier leur pertinence dans le développement de nouveaux antibiotiques moins susceptibles au phénomène de résistance. Ces résultats sont présentés au chapitre 4. Le prochain chapitre exposera les notions théoriques nécessaires à la compréhension des résultats.

CHAPITRE II

CONTEXTE THÉORIQUE

2.1 RMN du deutérium pour l'étude des membranes

La résonance magnétique nucléaire est une technique polyvalente pour mesurer le dynamisme des lipides (Blume, 1993). Elle est basée sur une propriété intrinsèque de certains noyaux atomiques, le spin, et son interaction avec un champ magnétique. Le proton (^1H) et le carbone (^{13}C) sont des noyaux difficilement utilisables dans le cas d'analyses *in vivo* puisque ces atomes sont présents non seulement dans les chaînes lipidiques des phospholipides constituant les membranes biologiques, mais aussi ailleurs dans les cellules. Ainsi, lors de l'analyse de cellules entières, le signal des membranes serait superposé aux signaux d'autres constituants de la cellule ce qui complexifierait le spectre (Seelig, 1977). C'est pourquoi les membranes sont habituellement observées à l'aide d'une sonde. Par exemple, depuis les années 70, le deutérium est utilisé pour étudier les perturbations des membranes artificielles et naturelles (Davis *et al.*, 1979 ; Seelig, 1977 ; Seelig et Macdonald, 1987). Les chaînes lipidiques peuvent être deutérées à une, plusieurs ou toutes les positions normalement hydrogénées ce qui renseigne sur la dynamique des lipides au coeur des bicouches lipidique.

2.1.1 Théorie générale de la RMN-ÉS

La spectroscopie de RMN est basée sur le spin, une propriété quantique que possèdent les noyaux atomiques ayant un nombre de masse ou un nombre atomique impairs et qui est défini par le nombre quantique de spin (I). Les $(2I + 1)$ états de spins existant pour un noyau sont du même niveau d'énergie en l'absence d'un champ magnétique. Par contre, il y a levée de dégénérescence en présence d'un champ magnétique externe (B_0) (effet Zeeman) tel qu'illustré à la figure 2.1 pour le cas de noyau de $I = 1$ comme le deutérium. La différence

d'énergie ΔE entre les niveaux est donnée par $\Delta E = \gamma_D \hbar B$ où γ_D est le rapport gyromagnétique du deutérium, \hbar est la constante de Planck divisée par 2π et B le champ magnétique local. Des transitions (résonances) sont donc possibles entre ces niveaux d'énergie ce qui est à la base de la spectroscopie RMN.

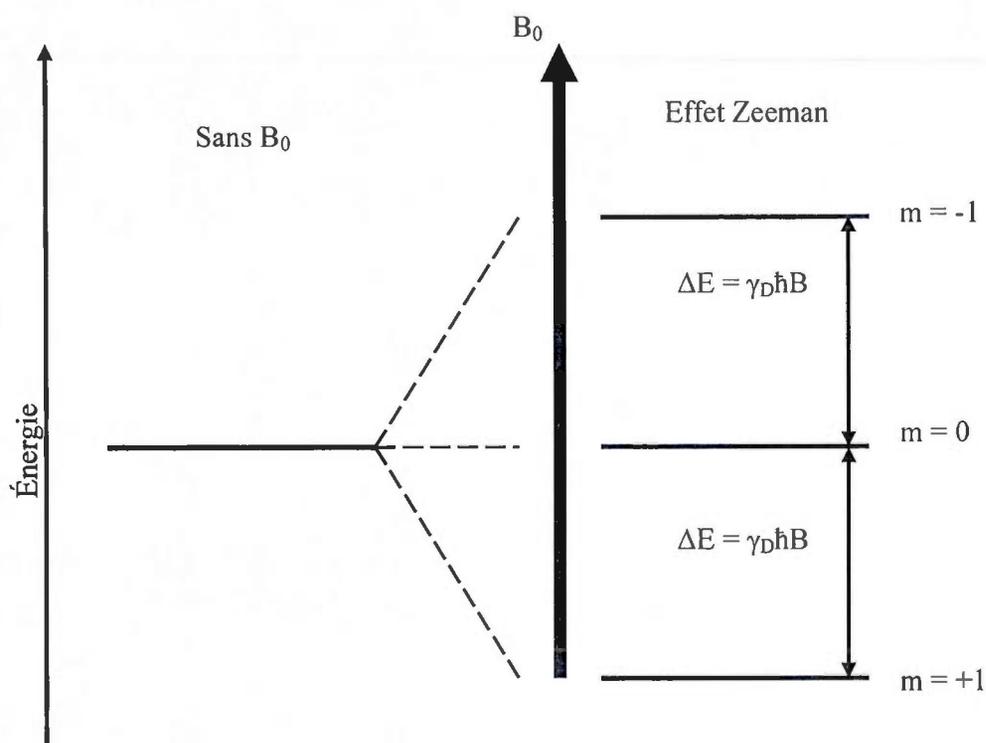


Figure 2.1 Niveaux d'énergie pour le noyau deutérium ($I = 1$) en absence et en présence du champ magnétique B_0 . Adapté de Marcotte, 2011.

Le moment angulaire de spin (\vec{I}) peut être imaginé comme un vecteur tournant autour de l'axe du champ magnétique pointant dans la même direction. La figure 2.2 illustre ce

mouvement de précession. Un noyau entre en résonance lorsqu'il est excité par une impulsion de radiation électromagnétique de même fréquence que la fréquence de son mouvement de précession (fréquence de Larmor).

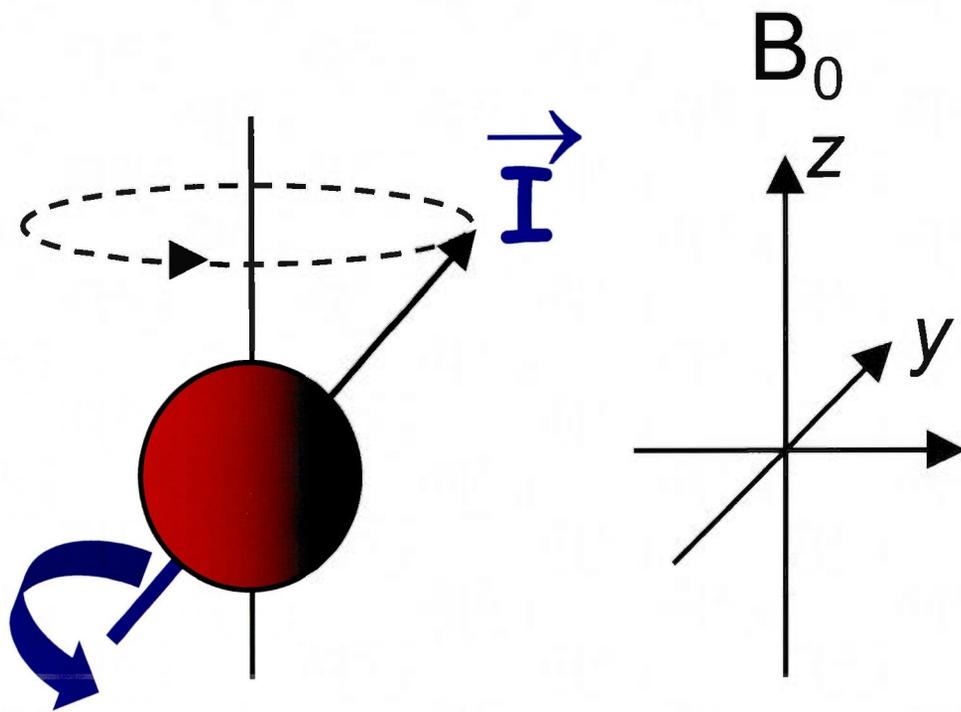


Figure 2.2 Direction du moment angulaire de spin (\vec{I}) par rapport au champ magnétique externe B_0 . Adapté de Marcotte, 2011.

Le noyau étant composé de particules chargées, un moment magnétique ($\vec{\mu}$) est associé au moment angulaire de spin. Ces vecteurs sont parallèles au champ magnétique externe dans le cas de noyaux ayant γ positif tel le deutérium. Vu que les moments magnétiques des noyaux d'un échantillon ne s'orientent pas de façon aléatoire en présence de B_0 , une magnétisation totale (M_0) se crée parallèlement au champ magnétique (figure 2.3). Une brève impulsion de radiation électromagnétique à la fréquence de Larmor du noyau étudié induit le phénomène de résonance ce qui modifie la direction de M_0 dans le référentiel tournant (figure 2.4(a)). Une impulsion de 90° bascule M_0 dans le plan x-y et les spins précessent en phase dans le référentiel tournant ce qui génère un courant détecté par la bobine de l'appareil, le signal de précession libre (FID) (figure 2.4(b)). Le FID s'amenuise à cause de diverses influences externes, telle la relaxation longitudinale (T_1) et transverse (T_2).

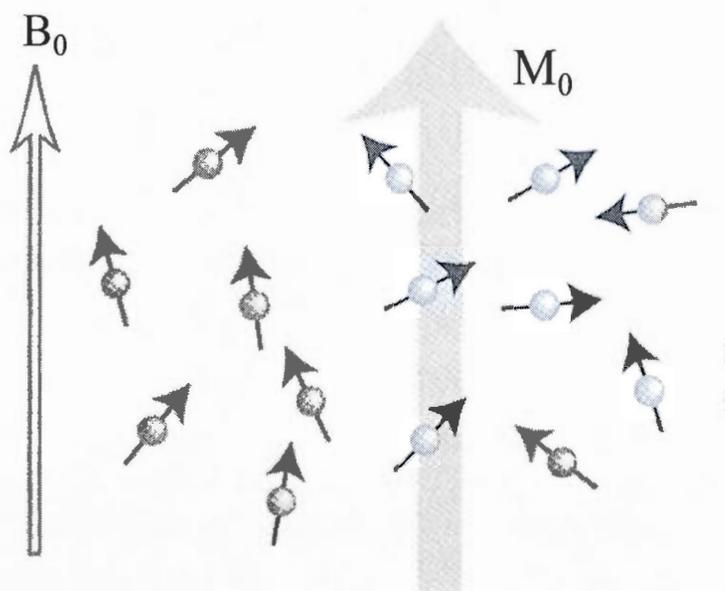


Figure 2.3 Magnétisation totale résultant de l'orientation non aléatoire des moments magnétiques en présence d'un champ magnétique externe dans un échantillon solide. Adapté de Levitt, 2001.

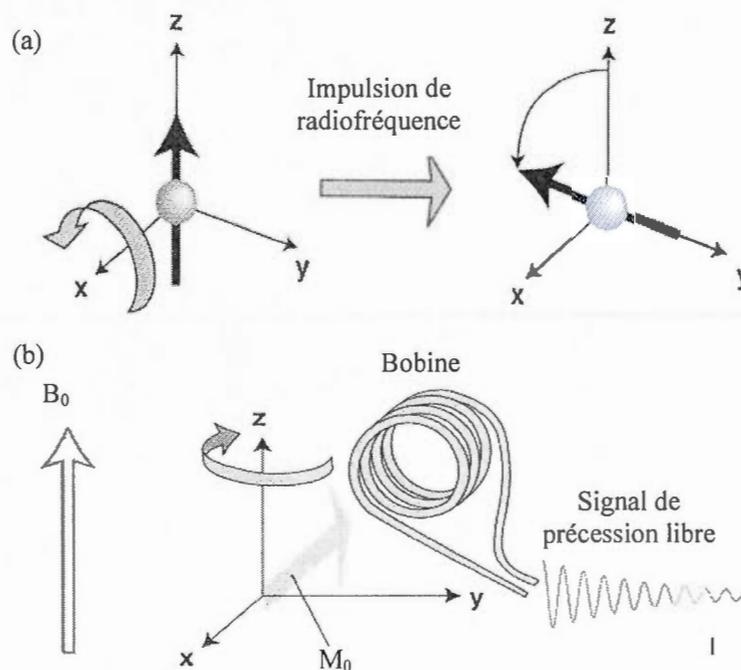


Figure 2.4 Basculement de la magnétisation lors d'une impulsion de radiofréquence équivalente à 90° (a). La magnétisation retourne parallèle au champ magnétique B_0 dans un mouvement de précession au tour de l'axe z pouvant être détectée par la bobine (b). Adapté de Levitt, 2001.

2.1.2 La résonance magnétique nucléaire de l'état solide appliquée aux membranes

À l'état liquide, les moments magnétiques des noyaux dans l'échantillon liquide se réorientent rapidement. Ce n'est pas le cas des solides qui sont moins fluides. Donc les interactions entre les spins nucléaires et leur environnement ne sont plus moyennées et dépendent des différentes orientations que peuvent adopter les nuages électroniques et du gradient de champs électrique par rapport aux moments magnétiques des noyaux qui eux sont fixes à cause de B_0 . En RMN-ÉS, les interactions sont donc de nature tensorielle. Voici les interactions dominantes en RMN-ÉS.

2.1.2.1 Anisotropie de déplacement chimique

Les nuages électroniques des atomes et de leurs liaisons sont composés de charges en mouvement ce qui crée un champ magnétique qui s'oppose à B_0 , c'est l'effet de blindage. La fréquence de résonance d'un noyau dépend du champ magnétique ressenti tel que démontré par l'équation 2.1 où γ est le rapport gyromagnétique et B le champ magnétique local. Ainsi, la fréquence de résonance (ν) d'un noyau au sein d'une molécule dépend de son environnement. De plus, le nuage électronique autour d'un atome est anisotrope donc ν dépend de l'orientation du nuage électronique par rapport au champ magnétique. En RMN-ÉS, l'anisotropie de déplacement chimique n'est pas moyennée et le spectre obtenu (spectre de poudre) est la contribution de raies individuelles caractérisant chacune des orientations possibles de chacun des environnements possibles tel qu'illustré à la figure 2.5.

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_{\text{eff}} \quad \text{ou} \quad \nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \gamma) \quad (2.1)$$

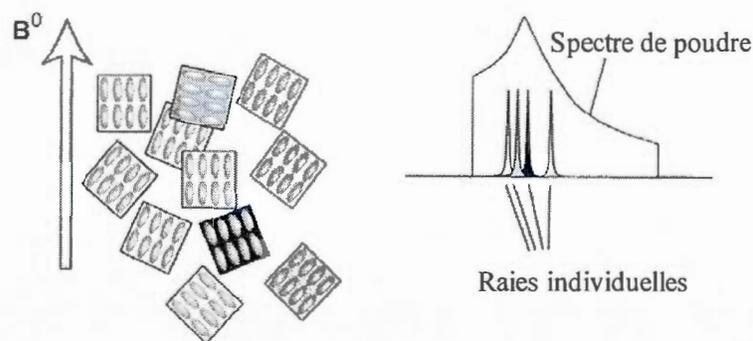


Figure 2.5 Schématisation de l'anisotropie de déplacement chimique en RMN-ÉS et de l'impact des orientations possibles des nuages électroniques par rapport à B_0 sur le spectre de poudre. Adapté de Marcotte, 2011.

L'intensité observée pour chaque fréquence de résonance des noyaux est proportionnelle à la distribution des orientations possibles des moments magnétiques par rapport à B_0 . Les têtes polaires des phospholipides sont composées d'un atome de phosphore ($I = 1/2$) et peuvent donc être étudiées en RMN-ÉS. Dans le cas de l'organisation macromoléculaire de phospholipides en une bicouche sphérique tel qu'illustré à la figure 2.6(a), beaucoup plus de têtes polaires sont orientées perpendiculaires à B_0 puisque la circonférence y est la plus grande à cette latitude comparativement aux autres orientations comme illustré à la figure 2.6(b). L'intensité du spectre de poudre est donc maximale à cette orientation tel qu'illustré à la figure 2.6(c) dans le cas des phospholipides en phase fluide pour lesquels le tenseur d'anisotropie de déplacement chimique a une symétrie cylindrique. Cette symétrie s'obtient par la rotation rapide des phospholipides sur leur axe longitudinal.

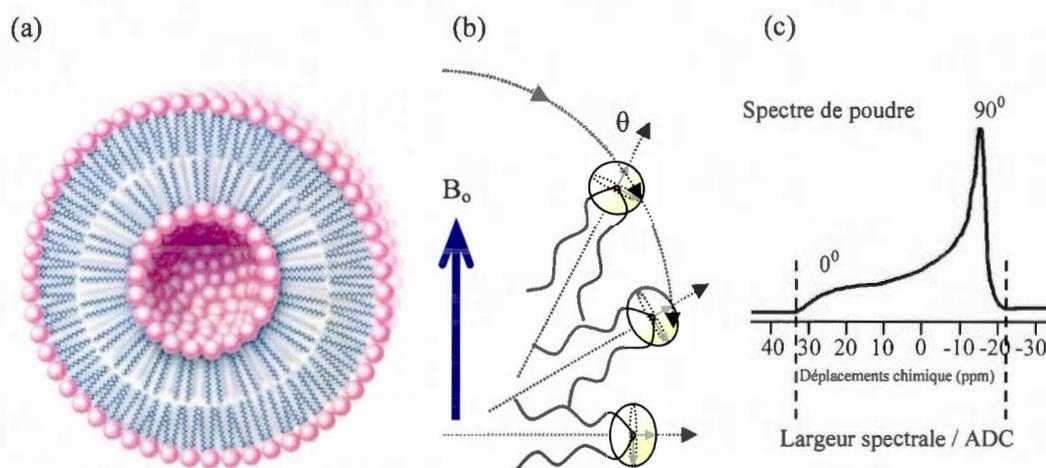


Figure 2.6 (a) Schématisation d'une bicouche sphérique de structure symétrique composée de phospholipides et (b) distribution des orientations des têtes polaires des phospholipides par rapport à B_0 et (c) le spectre RMN-ÉS résultant. Adapté de Marcotte, 2011.

2.1.3 Couplages dipolaires

Une autre interaction de nature tensorielle en RMN-ÉS est le couplage dipolaire. C'est l'interaction entre des noyaux voisins à travers l'espace. Le spin nucléaire crée un champ magnétique local ce qui cause l'interaction entre des noyaux homonucléaires ou hétéronucléaires résultant en un éclatement dipolaire qui élargit les spectres. La figure 2.7 illustre cette interaction où r est la distance internucléaire. Le couplage dipolaire peut être annulé en appliquant un découplage lors de l'analyse RMN. Par exemple, en analyse ^{31}P , une impulsion de radiofréquence de bande large irradie le proton (^1H) ce qui empêche le couplage dipolaire (^{31}P - ^1H) et simplifie l'analyse ^{31}P . Pour l'analyse de noyau de spin ≥ 1 comme le deutérium, le découplage n'est pas nécessaire puisque les interactions quadripolaires dominent le spectre.

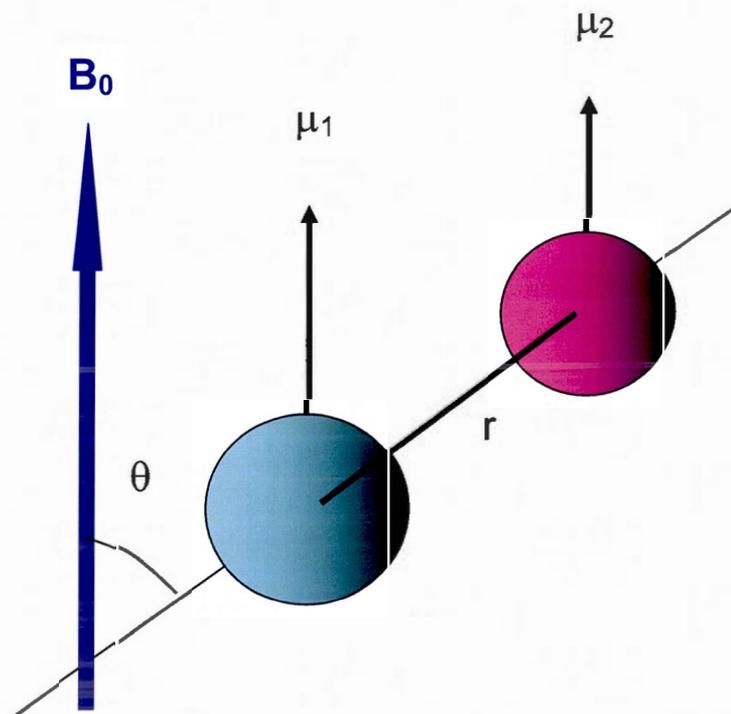


Figure 2.7 Schématisation du couplage dipolaire entre deux moments magnétiques. Adapté de Marcotte, 2011.

2.1.4 Les interactions quadripolaires

Les noyaux ayant un nombre quantique de spin ≥ 1 ont une distribution non sphérique de leur charge créant un moment quadripolaire. L'interaction de ce moment quadripolaire avec le gradient de champ électrique du noyau cause un couplage électrique quadripolaire. Cette interaction quadripolaire modifie les niveaux d'énergie des trois états de spin tel qu'illustré à la figure 2.8 pour un spin de 1 comme le deutérium. Les transitions possibles sont maintenant inéquivalentes ce qui crée un doublet symétrique sur le spectre RMN. La différence entre les fréquences de résonance des deux transitions énergétiques d'un noyau se nomme éclatement quadripolaire ($\Delta\nu_Q$).

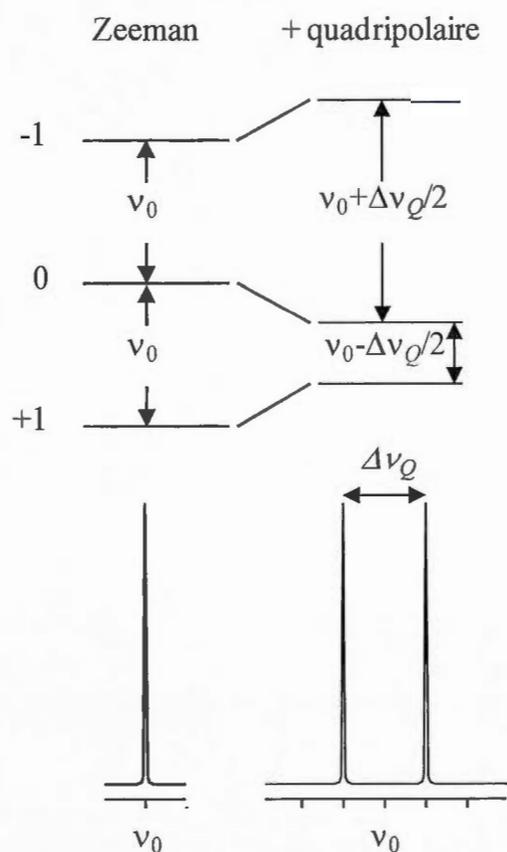


Figure 2.8 Modification des niveaux énergétiques due aux interactions quadripolaires. Adapté de Marcotte, 2011.

L'isotope deutérium de l'hydrogène possède un nombre quantique de spin équivalent à 1 et est donc un noyau quadripolaire. Le spectre théorique d'une membrane marquée à une seule position le long de la chaîne lipidique est illustré à la figure 2.9 pour le cas de vésicules de phospholipides distribués autour d'une MLV sphérique en phase fluide. Il s'agit de la superposition du spectre illustré à la figure 2.6(c) avec son image miroir.

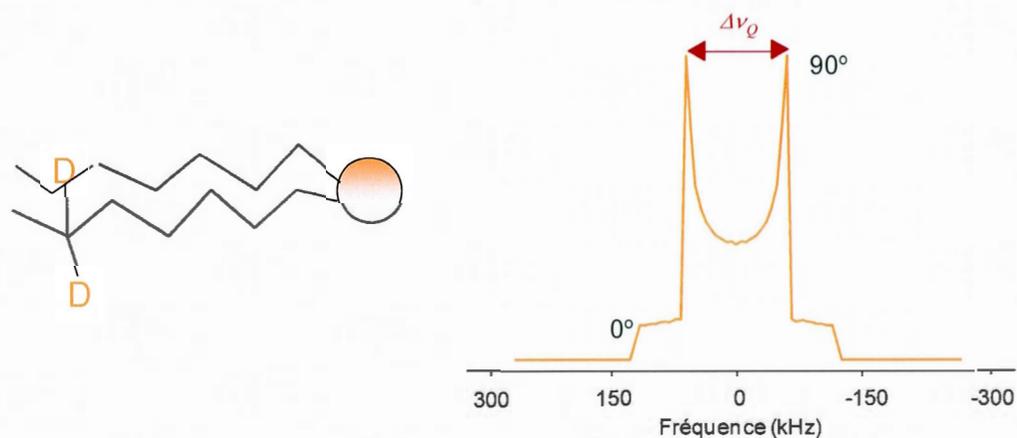


Figure 2.9 Spectre ^2H RMN-ÉS théorique de vésicules de phospholipides ayant une seule position deutérée le long de la chaîne acyle. Adapté de Marcotte, 2011.

2.1.5 Séquence d'écho quadripolaire

Le noyau deutérium relaxe rapidement suite à son excitation ce qui rend ce noyau difficile à étudier par RMN-ÉS. Les premiers points du signal de précession libre peuvent être manqués dû aux limitations de l'appareil, ce qui déforme les spectres et diminue grandement le rapport signal sur bruit. En utilisant une séquence d'écho quadripolaire illustrée à la figure 2.10, la magnétisation totale est refocalisée un certain temps τ après la dernière impulsion. Ainsi, l'appareil a le temps de détecter le début du signal de précession libre.

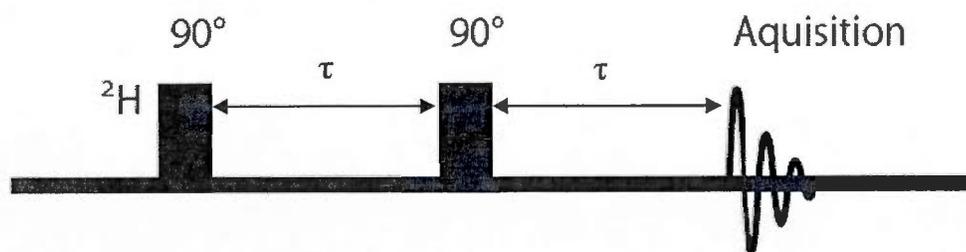


Figure 2.10 Schématisation de la séquence écho quadripolaire. Adaptée de Hahn, 1950.

2.1.6 Informations obtenues de l'analyse ^2H RMN-ÉS dans le cas des bicouches de phospholipides

L'éclatement quadripolaire renseigne sur l'orientation et la fluctuation de la liaison C- ^2H compte tenu du paramètre d'ordre (S_{C^2H}) qui reflète l'ordre du lien C- ^2H (Seelig et Macdonald, 1987). $\Delta\nu_Q$ et S_{C^2H} sont reliés par la constante de couplage quadripolaire A_Q du lien C- ^2H démontré par l'équation 2.2 (Levitt, 2001) où q est la charge électrique, Q est le moment quadripolaire électrique du noyau et h est la constante de Plank

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} A_Q (3 \cos^2 \theta - 1) S_{C^2H} \quad (2.2)$$

$$A_Q = \frac{e^2 q Q}{h}$$

Ainsi, la grandeur de $\Delta\nu_Q$ renseigne sur la fluidité de la bicouche. Dans le cas de vésicules sphériques composées de lipides deutérés tout au long des chaînes, le spectre attendu correspond à une superposition de doublets ayant différents $\Delta\nu_Q$ selon l'orientation θ des liens C- ^2H par rapport à B_0 et leur position sur les chaînes acyle tel qu'illustré à la figure 2.11 pour une MLV. La figure 2.12 illustre différentes conformations que peuvent adopter les chaînes lipidiques. Il est possible de constater visuellement que les mouvements vers la fin de la chaîne lipidique sont moins restreints et ont une plus grande amplitude que ceux du début de la chaîne près de la tête polaire. Ainsi S_{C^2H} des liens C- ^2H en bout de chaîne est inférieur à S_{C^2H} près de la tête polaire. À la figure 2.11, le doublet présentant $\Delta\nu_Q$ le plus petit correspond aux méthyle en bout de chaîne, tandis que celui avec le $\Delta\nu_Q$ le plus grand correspond à la position deutérée la plus près de la tête polaire, soit la position la moins mobile.

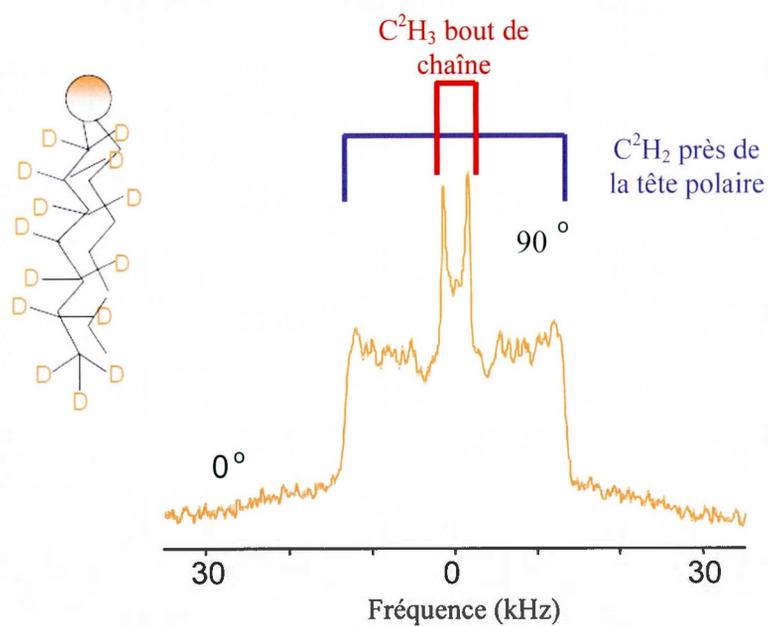


Figure 2.11 Spectre ^2H RMN-ÉS théorique de vésicules arrondies composées de phospholipides ayant des chaînes acyles complètement deutérées. Adapté de Marcotte, 2011.

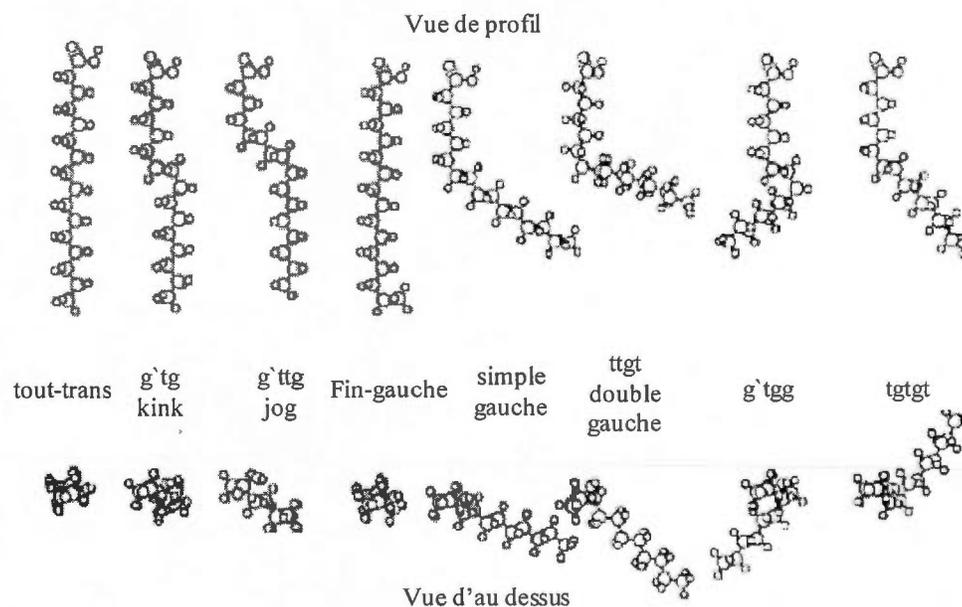


Figure 2.12 Conformations possibles des chaînes lipidiques vues de face et de haut. Adapté de Tuchtenhagen, Ziegler et Blume, 1994.

2.1.7 Analyse ^2H RMN-ÉS de bactéries intactes

Dans le cas d'études sur les membranes naturelles, le spectre se complexifie dû à la diversité des types de phospholipides composant les membranes cellulaires et l'hétérogénéité de la composition de ces dernières. Dans le cas d'études *in vivo* pratiquées sur les membranes d'*E. coli*, les éclatements quadripolaires individuels sont moins bien définis et le spectre résulte en une ligne de forme plutôt arrondie illustrée à la figure 2.13. Le spectre s'interprète de la même façon que celui des membranes artificielles (Pius, Morrow et Booth, 2012).

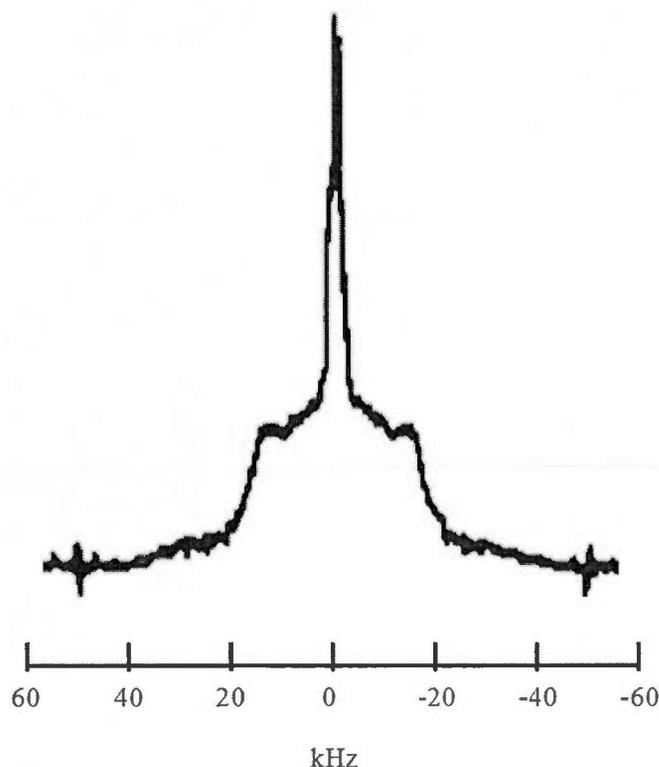


Figure 2.13 Spectre ^2H RMN-ÉS de cellules d'*E. coli* L51 intactes analysées *in vivo*. Adapté de Davis, 1979.

2.1.8 Phases lipidiques et impact sur le spectre ^2H RMN-ÉS

Jusqu'à maintenant, les concepts ont été développés pour les membranes artificielles relativement fluides soit en phase liquide cristalline. Par contre, les membranes peuvent être en phase gel lorsqu'elles sont à une température en dessous de la température de transition de phase gel-liquide cristalline (T_m). La figure 2.14 illustre deux structures que peuvent adopter les membranes, ainsi que le spectre de ^2H RMN-ÉS correspondant. La phase gel est caractérisée par une diminution du nombre de modes de mouvements potentiels et leur vitesse ce qui augmente les valeurs de $\Delta\nu_Q$.

La figure 2.15 illustre les principaux modes de mouvements des phospholipides en bicouche. Les mouvements impliquant des réorientations intramoléculaires, la rotation anisotropique le long de l'axe moléculaire et perpendiculaire à ce dernier sont toujours possibles dans une phase gel (Blume, 1993). Dans une phase liquide cristalline, le

mouvement de corps rigides à l'intérieur d'un espace conique ainsi que la diffusion translatrice Brownienne peuvent être observés. De plus, le mouvement collectif des phospholipides créant des ondulations de la membrane peut avoir lieu (Blume, 1993). La plus grande possibilité de mouvement de la phase liquide cristalline comparativement à la phase gel explique la différence entre les $\Delta\nu_Q$ ($\Delta\nu_Q$ phase liquide cristalline $<$ $\Delta\nu_Q$ phase gel) et les spectres obtenus. La RMN-ÉS du deutérium permet d'identifier la présence des différentes phases lipidiques dans une membrane modèle. Davis *et al.*, 1979 rapporte que l'analyse par ^2H RMN-ÉS de cellules d'*E coli* intactes à différentes températures révèle l'adoption de différentes phases lipidiques des membranes. L'analyse par ^2H RMN-ÉS de cellules intactes *in vivo* permet ainsi d'indiquer la présence de différentes phases lipidiques.

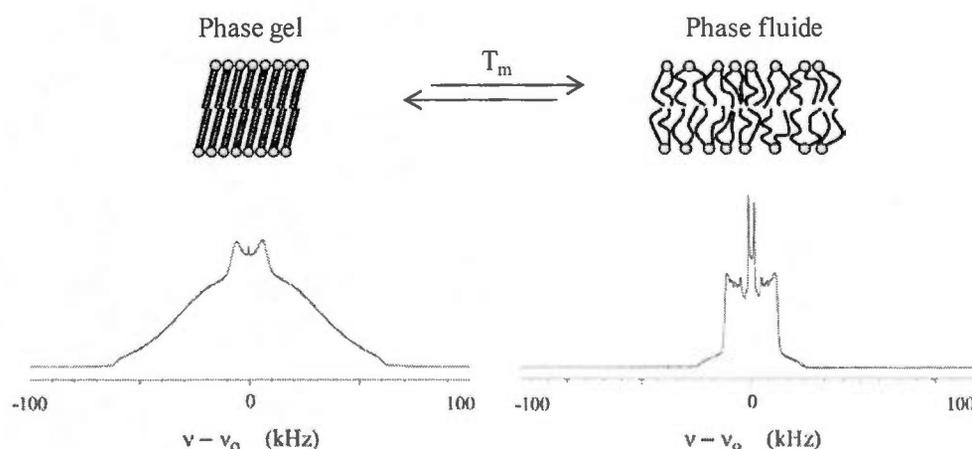


Figure 2.14 Schématisation de la phase gel et de la phase fluide des membranes ainsi que leurs spectres de ^2H RMN-ÉS respectifs dans le cas de bicouches de 1-docosahexaénoyle -2-palmitoyl -sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol (DPPC) et DPPC ayant les chaînes lipidiques deutérées (DPPC- d_{62} /cholestérol (75 :25)). Adapté de Davis, Clair et Juhasz, 2009 ; Eeman et Deleu, 2010.

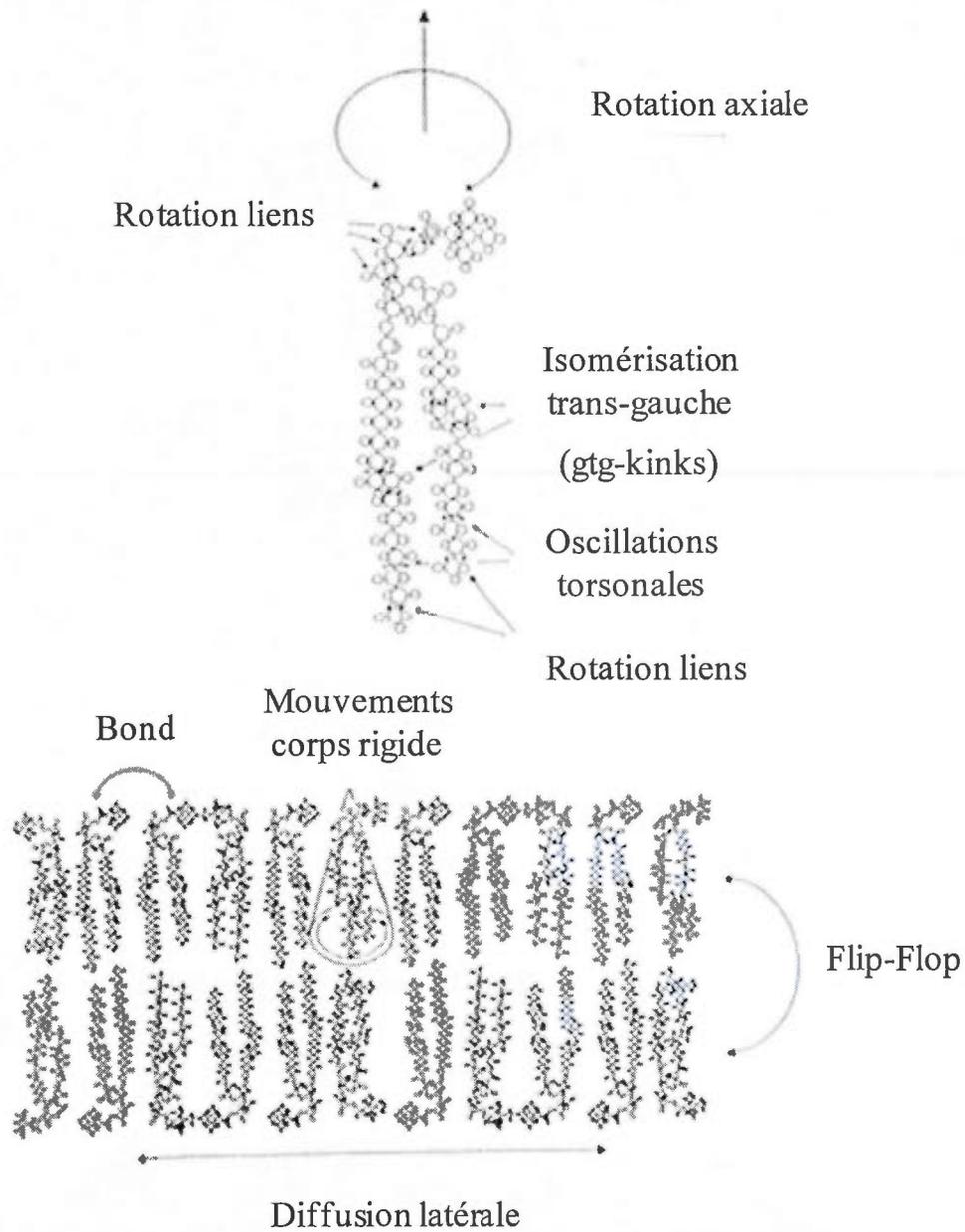


Figure 2.15 Schéma des différents modes de mouvements possibles des phospholipides en bicouche. Adapté de Blume, 1993.

2.1.9 Avantages et inconvénients de l'analyse ^2H RMN-ÉS

L'analyse de ^2H RMN-ÉS des membranes est avantageuse par rapport aux autres techniques puisqu'elle ne requiert pas la présence d'une sonde qui pourrait perturber la membrane. Les informations sont obtenues à partir des atomes des molécules qui composent naturellement les membranes, soit les phospholipides enrichis isotopiquement. De plus, c'est une technique non invasive qui permet l'analyse *in vivo* des phénomènes naturels d'interaction des membranes biologiques avec des agents externes (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012).

La faiblesse de la RMN du ^2H est sa sensibilité inférieure à celle de plusieurs autres techniques. Ainsi, une plus grande quantité d'échantillon à des taux de marquage élevés est requise pour avoir un bon rapport signal sur bruit dans les spectres. Aussi, la durée de l'analyse est relativement longue puisque beaucoup d'acquisitions doivent être faites sur un même échantillon pour obtenir un signal adéquat (Blume, 1993).

2.2 Biosynthèse des phospholipides chez *E. coli*

Pour palier cette faiblesse de la ^2H RMN-ÉS, un taux de marquage important est requis. Pour améliorer le pourcentage de marquage des membranes ou pour mieux contrôler celui des phospholipides, il est possible de muter des bactéries pour les rendre auxotrophes en précurseurs exogènes de phospholipides. La biosynthèse des phospholipides chez *E. coli* fut bien étudiée. L'incorporation des acides gras exogènes aux phospholipides par la biosynthèse est schématisée à la figure 2.16. En ayant des mutations sur les gènes produisant des protéines essentielles à la biosynthèse des phospholipides, les mutants d'*E. coli* peuvent devenir auxotrophes en précurseurs deutérés de phospholipides. L'initiation de la synthèse des acides gras endogènes est suivie par le cycle d'élongation de ces derniers qui peut produire des acides gras saturés ou insaturés. C'est à partir d'un des intermédiaires du cycle d'élongation des acides gras que débute la synthèse du lipide A, qui conduit à la synthèse des LPS. Le squelette de glycérol des phospholipides est synthétisé puis les chaînes acyle y sont ajoutées. L'acide phosphatidique résultant est converti en phospholipide et la nature des têtes polaires est contrôlée.

En présence d'acides gras exogènes, d'autres mécanismes conduisant à la synthèse des phospholipides s'ajoutent. Les acides gras de 12 carbones et plus traversent la membrane d'*E. coli* à l'aide de la protéine correspondant au gène *fadL*, protéine transporteuse d'acides gras à longues chaînes. Ils ne s'accumulent pas dans la cellule et sont plutôt incorporés aux phospholipides selon deux mécanismes. Les acides gras libres peuvent être couplés à la protéine ACP (protéine transporteuse de groupement acyle) pour être transférés à la position 1 d'un 2-acyle-GPE pour donner la phosphatidyléthanolamine (PE) (Heath, Jackowski et Rock, 2002 ; Knoll et Gordon, 1993 ; Rock et Jackowski, 1985). L'autre mécanisme est la conversion de la majorité des acides gras exogènes en acyle-CoA à l'aide de la protéine produite par le gène *fadD*, la synthétase de l'acyle-CoA. L'acyle-CoA peut être incorporé aux phospholipides ou être dégradé pour être utilisé comme source de carbone. La protéine acyle-CoA déshydrogénase produite par le gène *fadE* peut initier la dégradation du lipide exogène via une β -oxydation. Une mutation sur le gène *fadE* permet l'inhibition de l'oxydation des acides gras chez leur mutant d'*E. coli* L51 et LA8 (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012). L'acyle-CoA contenant le lipide exogène est en compétition avec l'acyle-ACP produit lors de la biosynthèse des acides gras d'*E. coli* pour occuper les deux positions sur le squelette de glycérol-3-phosphate, ce qui conduit à la synthèse de phospholipides où les chaînes lipidiques proviennent partiellement d'acides gras exogènes. Ceci a été exploité dans ce projet de recherche pour deutérer les phospholipides membranaires d'*E. coli* sauvage. Une autre approche serait l'utilisation de mutants d'*E. coli* auxotrophes en acide gras exogènes.

2.2.1 Mutants d'*E. coli* auxotrophes en acide gras exogènes

La conversion de l'acétyl CoA en malonyl-CoA est la première étape de l'initiation de la biosynthèse des acides gras. C'est une étape constituée de deux demi-réactions impliquant la carboxylation de la vitamine biotine qui se fait à l'aide de la protéine transcrite par le gène *accC*. Les souches L51 et LA8 présentent une mutation du gène *accC*, ce qui inhibe la synthèse des acides gras et les rend auxotrophes en acide gras exogène (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012). La synthèse des phospholipides se fait en utilisant beaucoup plus les acyle-CoA produits de lipides exogènes puisque la synthèse des acyle-ACP endogènes est inhibée. L'élongation des acides gras utilise un mécanisme cyclique tel qu'illustré à la figure 2.16. C'est la réaction entre le β -hydroxyacyle-ACP et la protéine

transcrite des gènes *fabA* ou *fabZ* qui conduit à deux possibilités qui résulteront en l'élongation d'un fragment saturé ou insaturé dans la chaîne lipidique synthétisée. Un mutant d'*E. coli* qui présente un défaut dans le gène *fabA* a été isolé, ce qui l'empêche de synthétiser le cis-3-énoyle-ACP, la forme conduisant à une chaîne lipidique insaturée (Silbert et Vagelos, 1967). Les lipides insaturés sont nécessaires pour assurer le bon fonctionnement des membranes bactériennes; ainsi, ce mutant est auxotrophe en acide gras insaturés.

2.2.2 Mutants d'*E. coli* auxotrophes en glycérol et phosphoglycérol

La synthèse du squelette des phospholipides, sn-glycérol-3-phosphate, se fait via la protéine glycérol phosphate synthase qui est transcrite par le gène *gpsA* et le précurseur dihydroxyacétone phosphate. Une mutation sur le gène *gpsA* était probablement la cause de l'auxotrophie en glycérol d'une souche isolée (Yoshiwa, Akutsa et Kyoku, 1988). Ainsi, la tête polaire des phospholipides peut être spécifiquement marquée. Ceci est également possible en utilisant une souche ayant le gène *pslB* muté, ce qui inhibe le transfert d'une chaîne lipidique au squelette glycérol des phospholipides. Les souches BB13 et BB26 étant auxotrophes en glycérol-3-phosphate, elles pourraient conduire au marquage de la tête polaire des phospholipides d'*E. coli* (Bell, 1974).

Plusieurs stratégies de marquage par utilisation de mutants auxotrophes peuvent être utilisées, mais l'incorporation d'acides gras exogènes par les souches sauvages d'*E. coli* est possible et donne d'excellents taux de deutération. Afin de quantifier le taux de deutération, le profil des acides gras d'*E. coli* pourrait être obtenu.

2.3 Détermination du profil en acide gras

Pour obtenir un bon rapport signal sur bruit en ^2H RMN-ÉS, il est important que les membranes soient suffisamment marquées. La détermination du pourcentage de deutération des chaînes lipidiques des phospholipides est une façon de quantifier le marquage. Les micro-organismes oléagineux ont la capacité d'emmagasiner des lipides sous forme de triglycérides en conditions de carences nutritives (Kosa et Ragauskas, 2011). *E. coli* ne possède pas cette capacité, et pratiquement tous les acides gras synthétisés sont transformés en phospholipides composant les membranes cellulaires et aucune réserve lipidique n'est créée. Comme discuté auparavant, une quantité négligeable d'acides gras libres demeure dans la cellule (Heath,

Jackowski et Rock, 2002). Les phospholipides sont isolés facilement à l'aide de micro-colonnes de silice en utilisant le méthanol comme éluant (Marty *et al.*, 1992). En analysant le profil en acide gras provenant des phospholipides d'*E. coli*, le pourcentage de deutération obtenu sera donc représentatif des chaînes lipidiques des membranes.

2.3.1 Principe de l'analyse FAME par GC-MS

Une technique utilisée pour déterminer la nature des chaînes lipidiques des phospholipides est l'analyse de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) des dérivés méthyl ester des acides gras libres provenant des phospholipides. C'est une méthode quantitative précise qui permet une séparation efficace des méthyl ester d'acide gras (FAME) provenant d'échantillons comme les lipides de la bactérie *E. coli*. L'identification des composés est possible sans utiliser de standard pourvu que cette molécule ait déjà fait l'objet d'études et que son spectre de masse soit inclus dans les bases de données.

Les analytes doivent être des composés assez volatils pour pouvoir être sous forme gazeuse lors de leurs injections à des températures assez faibles pour éviter d'abîmer la colonne. Ni les phospholipides, ni les acides gras les composant peuvent être analysés directement. Par contre, les dérivés méthyl ester des acides gras sont assez volatils pour être analysés et leur séparation chromatographique ainsi que leur détection et identification se fait efficacement par GC-MS.

2.4 Détermination de la viabilité cellulaire par réduction du MTT

2.4.1 Importance de déterminer la viabilité cellulaire

L'analyse des cellules entières par ^2H RMN-ÉS pousse l'étude de la réponse physiologique de l'échantillon aux changements de conditions. Ces changements se résument en trois facteurs principaux. Premièrement, la densité cellulaire est beaucoup plus grande dans l'échantillon analysé qu'elle ne l'est en phase exponentielle de croissance cellulaire ce qui est nécessaire pour assurer une grande quantité de membranes marquées et ainsi, un bon rapport signal sur bruit (Grivet et Delort, 2009). Par conséquent, la concentration de rejets cellulaires et de molécules permettant le signalement cellulaire est possiblement plus élevée. Deuxièmement, les cellules ne sont pas toujours analysées dans le même milieu que le milieu

de culture ce qui pourrait induire une réponse physiologique. Finalement, les cellules sont analysées dans un environnement clos ce qui limite les échanges gazeux. Ainsi, tous ces facteurs pourraient contribuer à la dégradation de l'échantillon au bout de l'analyse ^2H RMN-ÉS qui se traduirait par la baisse de la viabilité des cellules. La détermination de la viabilité cellulaire des organismes dans l'échantillon suite à son analyse est importante puisqu'elle permet de quantifier à quel point la ^2H RMN-ÉS sur des cellules entières peut être considérée *in vivo*.

2.4.2 Principe de la technique

La technique utilisée pour valider la viabilité cellulaire est la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényle terazolium (MTT), qui est largement utilisée dans la littérature (Wang *et al.*, 2010). Son principe repose sur la conversion du MTT hydrosoluble en cristaux de formazan insolubles dans l'eau en présence d'enzymes réductrices (déshydrogénases) chez les cellules vivantes. Une fois isolés, les cristaux dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont quantifiés spectrophotométriquement et leur concentration est directement proportionnelle à l'activité métabolique de l'échantillon cellulaire (Wang *et al.*, 2010).

2.4.3 Avantages et inconvénients de cette technique

Différentes techniques existent pour évaluer la viabilité des cellules et les quatre plus utilisées ont été comparées par Wang *et al.*, 2010. Suite aux conclusions de cet article, la détermination de la viabilité cellulaire par réduction du MTT se distinguait par sa simplicité et par la justesse des résultats obtenus en comparaison aux autres techniques. La réduction du MTT était souvent peu reproductible et beaucoup de variations existaient d'une étude à l'autre. Récemment, les causes d'interférences majeures ont été identifiées ce qui a grandement amélioré la précision et la justesse de cette technique et justifie son utilisation dans notre étude. Ces interférences sont, entre autres, la présence de plus de 20 μL de milieu de culture résiduel qui empêche la dissolution totale des cristaux de formazan par le DMSO ainsi que l'accès limité du MTT aux sites de réduction causé par l'agglomération des cellules liées par les cristaux de formazan insolubles due à des densité cellulaires plus grandes que 1,1 unité d'absorbance à 600 nm.

Les déshydrogénases responsables de la réduction du MTT sont principalement localisées dans la chaîne respiratoire des cellules. La réduction du MTT est donc représentative de l'efficacité cellulaire du transport des électrons. C'est l'information recueillie qui permet de quantifier l'activité métabolique de l'échantillon et d'en conclure la viabilité cellulaire de l'échantillon. Cependant, il y a un risque que l'efficacité des déshydrogénases ne soit pas représentative de la viabilité cellulaire de l'échantillon donc la réduction du MTT présente ce désavantage.

2.5 Description des cellules Vero

La lignée cellulaire Vero a été isolée des cellules épithéliales des fibroblastes de rein du singe vert Africain *Cercopithecus aethiops*. C'est une lignée cellulaire qui croit en continue sans devenir sénescence. Le tapis cellulaire formé est sensible à certaines souches de virus comme *Herpes simplex* ce qui fait de cette lignée cellulaire une bonne représentation d'un tissu épithélial humain (Rashid *et al.*, 2009).

2.6 Principe de la coloration au rouge neutre

La coloration au rouge neutre est une technique colorimétrique qui permet de quantifier la viabilité cellulaire d'un tissu. Lorsqu'ajouté au milieu de culture, le colorant vital est préférentiellement incorporé dans les cellules en santé où il se concentre dans les lysozymes (Allison et Young, 1964). Suite au lavage du tissu cellulaire, le colorant demeure dans les cellules saines laissant les cellules mortes incolores. La mesure de l'absorbance du rouge neutre extrait à base d'un tampon permet de quantifier la viabilité cellulaire d'un tissu (Finter, 1969).

2.6.1 Avantages et inconvénients de cette technique

La coloration au rouge neutre permet une représentation juste de la viabilité cellulaire d'un tissu. Par contre, cette technique est laborieuse et destructive de l'échantillon (Finter, 1969).

2.7 Détermination des effets cytotoxiques et antiviraux de la marennine

La détermination de l'effet cytotoxique des pigments sur les cellules Vero débute par l'exposition de ces dernières aux pigments à diverses concentrations. Par la suite, la viabilité du tissu cellulaire est déterminée par la coloration au rouge neutre. L'effet cytotoxique des pigments est exprimé en pourcentage de destruction cellulaire par rapport à un témoin cellulaire non exposé.

L'effet antiviral est déterminé de façon similaire où les cellules sont non seulement exposées aux pigments mais à une quantité fixe du virus *Herpes simplex hominis* de type 1. Si la marennine a un effet antiviral, les cellules exposées au virus et aux plus fortes concentrations de marennine vont mieux survivre que le témoin exposé au virus uniquement. Ainsi, l'effet antiviral de la marennine est exprimé en pourcentage de protection cellulaire.

Dans le prochain chapitre, un article scientifique soumis à la revue *BBA-Biomembranes* est présenté. Il porte sur l'étude des interactions entre des agents antimicrobiens et les membranes d'*E. coli* analysées *in vivo* par ^2H RMN-ÉS.

CHAPITRE III

AN IN VIVO ^2H SOLID-STATE NMR STUDY OF THE EFFECT OF ANTIBACTERIALS

ON INTACT NON-MUTATED ESCHERICHIA COLI

Catherine Tardy Laporte¹; Alexandre A. Arnold¹; Bertrand Génard²; Romain Gastineau³,
Michèle Morançais⁴, Jean-Luc Mouget³, Réjean Tremblay²; Isabelle Marcotte^{1*}

¹Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, C. P. 8888, Montréal, Québec,
H3C 3P8, Canada

²ISMER, Université du Québec à Rimouski, C. P. 3300, Rimouski, Québec, G5L 3A1,
Canada,

³MMS Le Mans, Université du Maine, Avenue Olivier Messiaen 72085 Le Mans Cedex 9,
France

⁴MMS Nantes, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, Nantes 44322, Cedex 3, France

*Auteur correspondant: Isabelle Marcotte

marcotte.isabelle@uqam.ca

Cet article scientifique est soumis au journal *BBA Biomembranes* (BBAMEM-12-242.) Les parties expérimentales et la rédaction de l'article ont été effectuées par Catherine Tardy Laporte à l'exception du calcul des moments qui a été effectué par Alexandre A. Arnold et l'extraction des acides gras qui a été effectué par Bertrand Génard. Les corrections et améliorations à la rédaction ont été effectuées par tous les coauteurs, en fonction de leur champ d'expertise.

3.1 Résumé

La RMN-ÉS est une technique utile qui permet de sonder l'organisation et le dynamisme des phospholipides dans les bicouches. L'interaction des molécules avec les membranes s'étudie habituellement avec des systèmes modèles; par contre la complexité de la composition des membranes biologiques justifie l'investigation sur des cellules intactes. Nous avons donc développé un protocole pour deutérer les phospholipides membranaires d'*E. coli* non mutées pour faciliter les études ^2H RMN-ÉS sur des bactéries intactes. En exploitant la biosynthèse naturelle des lipides et en utilisant l'acide palmitique deutéré, nos résultats démontrent 76% de deutération des chaînes alkyles des phospholipides. Les effets de divers antibactériens ont été étudiés afin de vérifier la réponse des *E. coli* aux membranes deutérées. Le spectre ^2H RMN-ÉS combiné à l'analyse spectrale des moments supporte l'insertion de la chaîne lipidique de l'antibiotique polymyxine B dans la membrane bactérienne. Il a été démontré que la disponibilité des membranes deutérées des bactéries est un facteur important dans le mécanisme d'action des molécules qui dépendent des interactions avec les lipopolysaccharides. C'est le cas des nanoparticules de fullerénol qui présentent un effet différent sur les cellules intactes que sur un modèle DPPC/DPPG ce qui souligne la complémentarité des deux approches. Nos résultats démontrent également que la rigidification des membranes peu jouer un rôle important dans l'activité biocide du détergent chlorure de cetyltriméthylammonium. Finalement, l'effet antibactérien de pigments de type marennine produits par des microalgues marines a été mis en évidence. Nous avons été capable de détecter une perturbation membranaire différente pour la forme interne et externe du pigment ce qui procure une information pertinente sur leur mécanisme d'action et suggère des différences spectrales.

Mots clés : Bactérie Gram négatif, interactions membranaires, polymyxine B, fullerène polyhydroxylé, chlorure de cetyltriméthylammonium, pigment de type marennine

3.2 Abstract

Solid-state NMR is a useful tool to probe the organization and dynamics of phospholipids in bilayers. The interactions of molecules with membranes are usually studied with model systems; however the complex composition of biological membranes motivates such investigations on intact cells. We have thus developed a protocol to deuterate membrane phospholipids in non-mutated *E. coli* to facilitate ^2H solid-state NMR studies on intact bacteria. By exploiting the natural lipid biosynthesis pathway and using perdeuterated palmitic acid, our results show that a 76% deuteration of the phospholipid fatty acid chain was attained. To verify the responsiveness of these membrane-deuterated *E. coli*, the effect of various antimicrobials was studied. ^2H solid-state NMR spectra combined to spectral moment analysis support the insertion of the antibiotic polymyxin B lipid tail in the bacterial membrane. The availability of membrane-deuterated bacteria was shown to be important in cases where the antibiotic action of molecules relies on the interaction with lipopolysaccharides. This is the case of fullerene nanoparticles which showed a different effect on intact cells when compared to model DPPC/DPPG, stressing the complementarity of the two approaches. Our results also demonstrate that membrane rigidification can play a role in the biocide activity of the detergent cetyltrimethylammonium chloride. Finally, the antibacterial effect of a marennine-like pigment produced by marine microalgae was evidenced. We were able to detect a different perturbation of the bacteria membranes by the intra- and extracellular forms of the pigment, thus providing valuable information on their action mechanism and suggesting structural differences.

Keywords: Gram-negative bacteria, membrane interactions, polymyxin B, polyhydroxylated fullerene nanoparticles, cetyltrimethylammonium chloride, marennine-like pigment

3.3 Introduction

New antimicrobial agents are required to act against the emergence of pathogenic bacteria that are resistant to the commonly used antibiotics. Principally designed from less than ten types of molecular scaffolds (Barrett et Barrett, 2003 ; Pasquale *et al.*, 2010), their action mechanism targets few cellular processes such as cell wall and protein biosynthesis as well as DNA replication and repair. Antibiotic resistance is due to their excessive consumption by human patients but could also be related to the widespread routine feeding of antibiotics to livestock (World Health Organisation, 1997). Bacteria inevitably develop resistance to treatments within a time frame of months to years and, unfortunately, resistant strains can transfer their antibiotic resistance genes across pathogen cells from different species (Walsh, 2000). The problem of emerging multidrug resistant strains is faced with the insufficient production of new antibiotics by pharmaceutical companies (Overbye et Barrett, 2005).

Identification and study of antimicrobial peptides (AMPs), biosynthesized by different organisms including plants, insects, anurans and mammals, is currently a dynamic field of research. AMPs are strongly cationic and generally form amphipathic secondary structures such as α -helices and β -sheets (Matsuzaki, 2001). They can selectively interact with bacterial membranes which, contrary to eukaryote membranes, are negatively charged. Indeed, the inner and outer membranes of Gram-negative bacteria are mainly composed of zwitterionic phosphatidylethanolamine (PE), anionic phosphatidylglycerol (PG) and cardiolipin (CL), while lipopolysaccharides (LPS) are only found in the outer membrane (Warschawski *et al.*, 2011). Via electrostatic interaction, AMPs permeabilize the lipid bilayer by creating pores, or solubilize the membrane in a detergent-like mechanism (Jenssen, Hamill et Hancock, 2006). To develop new efficient antibiotics against resistant bacteria, the action mechanism of membrane-disrupting antimicrobials must be studied (Arouri, Dathe et Blume, 2009).

Deuterium solid-state nuclear magnetic resonance (^2H -SS-NMR) is an excellent non-invasive technique to probe membrane perturbations because it provides information on the lipid acyl chains' organization and dynamics in the bilayer core. Moreover, the non-perturbing isotopic (^2H) labeling does not change the lipid properties contrarily to the addition of large reporter molecules used in other methods (Davis *et al.*, 1979 ; Seelig et

Macdonald, 1987 ; Strandberg et Ulrich, 2004). ^2H -SS-NMR studies have improved our knowledge of the action of antimicrobials on biomembranes, principally using model membranes as reviewed by Strandberg and Ulrich (Strandberg et Ulrich, 2004). However, considering the complexity of membrane composition, especially the presence of lipopolysaccharides in the outer membrane of Gram-negative bacteria, the interaction of exogenous molecules should ideally be studied *in vivo*, at least as an initial step before refining the interaction mechanism with model membranes.

The lipid metabolism of organisms such as bacteria is known and could be exploited to successfully deuterate membrane lipids of wild-type strains. *Escherichia coli* is a good candidate because of the simplicity of its membrane composition with just three types of phospholipids, i.e. 75% PE, 20% PG and 5% CL, composed of only three different fatty acid chain lengths (C16, C17 and C18) (Dowhan et Bogdanov, 2002 ; Esfahani, Barnes et Wakil, 1969). So far in terms of NMR studies of bacteria, membrane lipids have been deuterated in *Acholeplasma laidlawii* (Jarrell *et al.*, 1982) and in strains of *E. coli* engineered to uptake exogenous (deuterated) fatty acids, and intact cells were analyzed by ^2H -SS-NMR (Davis *et al.*, 1979 ; Nichol *et al.*, 1980 ; Pius, Morrow et Booth, 2012). This strategy was carried out on L51 and LA8 auxotroph strains defective in fatty acid oxidation and grown in a solution containing exogenous perdeuterated palmitic acid (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012). However, the disadvantage of this method is to rely on the availability of considerably mutated strains.

The objective of this work was therefore to establish a protocol to deuterate the phospholipid acyl chains in the membranes of *E. coli* bacteria that are non-mutated. Wild-type *E. coli* are readily available and known to use exogenous fatty acids for their phospholipid biosynthesis, thus enabling acyl chain deuteration (Sinensky, 1971). The ^2H labeling protocol is presented as well as the phospholipid profile of the bacteria membranes compared to non-labeled organisms. The temperature behavior of intact *E. coli* membranes is also shown. Then the responsiveness of these *E. coli* to antimicrobials is assessed *in vivo* by ^2H -SS-NMR using three different types of molecules, namely the antibiotic polymyxin B, fullerol ($\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$) nanoparticles as well as the detergent cetyltrimethylammonium chloride. Finally the non-mutated *E. coli* bacteria with deuterated phospholipids are exploited

to investigate the antibiotic effect and membrane interaction of a marennine-like blue pigment by ^2H -SS-NMR. Marennine is a water-soluble polyphenol which structure is not fully characterized (Pouvreau *et al.*, 2006a). It is produced by the blue diatom *Haslea ostrearia*, a marine microalga involved in the greening of oysters, and it is thus ingested by humans. Marennine exists in an intracellular form which accumulates mainly at the apical regions of the algal cells, and an extracellular one which is released into the aquatic environment (Mouget *et al.*, 2005). Both forms of marennine differ with regard to their molecular weight and spectroscopic characteristics (Pouvreau *et al.*, 2006a). Furthermore, they are known for their anticancer and antiviral activity but also for their ability to inhibit the development of pathogenic marine bacteria such as *Vibrio aestuarianus* (Gastineau *et al.*, 2012b). In the present study, a marennine-like pigment produced by a new species of blue diatom, *H. provincialis* (Gastineau *et al.*, 2012b) is evaluated.

3.4 Material and Methods

3.4.1 Materials

All solvents (HPLC grade), deuterium depleted water as well as 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sodium chloride, polymyxin B sulfate (PxB) and cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) solution (25% w/w) were purchased from Sigma Adrich (Oakville, ON, Canada). Fullerenol ($\text{C}_{60}(\text{OH})_{16-18}(\text{ONa})_{6-8}$) was obtained from M.E.R Corporation (Tucson, AZ, USA). Dodecyl phosphocholine (DPC) was ordered from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) while deuterated palmitic acid (PA- d_{31}) was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). Bio-tryptone and yeast extract were purchased from Bioshop (Burlington, ON, Canada). The fatty acid methyl ester (FAME) mixture ($\text{C}_4\text{-C}_{24}$) was provided by Supelco (Bellefonte, USA).

3.4.2 Incorporation of deuterated palmitic acid in *E. coli* membrane

PA- d_{31} (0.25 mM) was sterilely incorporated into DPC (1 mM) micelles by heating the mixture at 95°C until the fatty acid (FA) crystals had melted. The solution was flash-frozen and warmed to room temperature until a clear solution was obtained and used immediately. One heat/freeze cycle was generally necessary. Ampicillin-resistant *E. coli* pPD117 (kindly provided by Prof. S. Jenna, UQAM) were then grown in LB medium (10 g of Bio-tryptone, 5

g of yeast extract and 10 g of NaCl per water liter) supplemented with the DPC/PA-d₃₁ micelle solution. Cells grown at 37°C under moderate shaking were harvested in the mid-log growth phase at an OD₆₀₀ of 0.4. *E. coli* cells were grown at 37°C in a medium supplemented with PA-d₃₁ incorporated into DPC micelles to ensure an optimal contact with the outer-membrane of bacteria and efficient subsequent uptake by the *fadL* protein. Cells were pelleted (1500 G for 10 min at room temperature) and rinsed twice with 0.9% (w/w) NaCl solution, followed by a final rinsing step with a saline solution made of ²H-depleted water to limit the NMR signal from naturally-occurring HDO. ²H-SS-NMR experiments were carried out on fresh samples a maximum of 2 hours after harvesting.

3.4.3 Exposition of *E. coli* to antimicrobial agents

PxB, fullerol and CTAC were solutions prepared with ²H-depleted water and NaCl (0.9% w/w). An appropriate amount of antimicrobial agent solution was added to deuterated pelleted cells and the samples were gently mixed. Concentrations of approximately 1%, 5% and 1% were respectively determined for PxB, fullerol and CTAC using the dry weight of the bacteria. These concentrations were used to compare with similar studies carried out on model membranes (Beyer, 1986 ; Brisebois *et al.*, 2012 ; Clausell *et al.*, 2003). Finally, 57 µL of the sample were transferred into a 4-mm ZnO rotor and immediately analyzed by ²H-SS-NMR. The intra- and extracellular forms of the pigment produced by *H. provincialis* were extracted and purified according to the methods developed for marennine (Pouvreau *et al.*, 2006a). Saturated pigment solutions were prepared in seawater and bacteria were exposed to approximately 2 mol% of marennine using the dry weight of bacteria and estimating a pigment molecular weight of 10 kDa according to preliminary characterization of marennine (Pouvreau *et al.*, 2006a).

3.4.4 Lipid profile analysis

The lipid profile analysis was performed in triplicate on three different freshly labeled and unlabeled compare bacteria samples which were flash-frozen, vacuum-dried and stored at -20°C prior to lipid extraction. Lipid extraction was carried out on approximately 10 mg of lyophilized bacteria sample using CH₂Cl₂/MeOH (2:1 v/v) and 0.88% KCl solution in a Potter glass homogenizer (Pernet et Tremblay, 2003). Lipid extract was evaporated to dryness and lipids were recovered by washing three times with 500 µl of CH₂Cl₂/MeOH (98:2 v/v)

then deposited at the top of a silica gel column (30 X 5 mm i.d. packed with Kieselgel 60, 70–230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) hydrated with 6% water. Neutral lipids (including triglycerides, free FAs and sterols) were eluted with 10 mL of CH₂Cl₂/MeOH (98:2 v/v) and polar lipids (phospholipids) recovered with 20 mL of MeOH (Marty *et al.*, 1992). Polar lipids were evaporated at 40°C and transesterified in 2 mL of H₂SO₄ (2% in MeOH) and 0.8 mL of toluene for 10 minutes at 100°C.

They were then analyzed in a gas phase chromatograph (Trace GC Ultra, ThermoScientific, Asheville, NC, USA) equipped with an autosampler and PTV-type injector (model ITQ900) for FA composition. Separation was done on a Supelco Omegawax 250 capillary column (30-m long, 0.25-mm internal diameter, 0.25- μ m film thickness). 1 μ L of the sample was injected in splitless mode using an injector temperature of 90°C. Helium at a flow rate of 1 mL/min was used as carrier gas. The temperature program employed consisted of a 2 min-period at 100°C, followed by a 1-min period at 140°C reached after a 10°C/min ramp. A 5°C/min ramp was then applied followed by a 2-min final step at 270°C. The detector and ionization source temperatures were 250 and 225°C, respectively. Full-scan type detection was employed in positive mode on an *m/z* interval of 50-650. Peak identification was done with the C₄-C₂₄ FAME mix. Quantification was performed using external calibration curves with concentrations ranging from 0.3 to 20 μ g/mL. The deuterated palmitic acid methyl ester standard was prepared by transesterification of PA-d₃₁ as described above. Data acquisition and analysis were done with Excalibur 2.1 software from Thermo Scientific. C19:0 was used as an internal standard.

3.4.5 Cellular viability assay

An MTT reduction assay was used to determine the cellular viability (Wang *et al.*, 2010). Bacteria cell samples were diluted in fresh LB medium to an absorbance of ~0.1 at 600 nm. 20 μ L of MTT solution (5 mg/mL) stored at -20°C then heated at 37°C were added to 200 μ L of cell suspension and incubated at 37°C for 20 min. Formazan crystals were pelleted (pulse-centrifugation) and dissolved in 1 mL of DMSO at room temperature after the LB medium was removed. Optical absorbance readings at 550 nm were done after 15 min of stabilization. These assays were performed in triplicate.

3.4.6 ^2H Solid-state NMR analysis and moment analysis

All spectra were recorded on a hybrid solution/solid-state Varian Inova Unity 600 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) operating at a frequency 92.1 MHz for deuterium. ^2H -SSNMR spectra were obtained using a solid-echo pulse sequence (Davis *et al.*, 1976) with a pulse length of 3 μs , an interpulse delay of 20 μs and a repetition delay of 500 ms. Typically 20k scans were acquired and a line broadening of 150 was applied. Data were analyzed using Matlab® software (Beek, 2007). The equilibration time in the case of multi-temperature experiments was 15 min.

Spectral moments are used to quantify the intensity distribution on the spectra as a function of quadrupolar splitting and are defined as follows (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012):

$$M_n = \frac{\int_0^{\infty} \omega^n f(\omega) d\omega}{\int_0^{\infty} f(\omega) d\omega}$$

ω is the angular frequency with respect to the Larmor angular frequency ω_0 while $f(\omega)$ is the intensity at that frequency, thus $f(\omega)$ describes the spectrum lineshape. The first spectral moment (M_1) reflects the average orientational order parameter of the C- ^2H bonds, i.e., the mean of the distribution of order parameters (Davis, 1979). The second spectral moment (M_2) gives the mean square value of the quadrupolar splittings. M_1 and M_2 can be used to calculate the relative mean square width (Δ_2) of the distribution of quadrupolar splittings:

$$\Delta_2 = \frac{M_2}{1.35 \times M_1^2} - 1$$

The description of ^2H NMR spectra with the spectral moments is particularly useful when a distribution of quadrupolar splittings is present and specific quadrupolar splittings cannot be measured. Changes of M_1 and M_2 will be particularly sensitive to changes from a gel phase to fluid phase. First and second spectral moments were calculated using dedicated scripts implemented in the MatNMR software.

3.5 Results

3.5.1 Incorporation of deuterated palmitic acid into cellular membranes of *E. coli*

Results of FA profiles in phospholipids of *E. coli* membranes before and after application of the deuteration protocol show that 76 % (w/w) of the phospholipids have deuterated acyl chains with a length corresponding to that of palmitic acid, as displayed in Table 3.1. No other deuterated FAs were detected, indicating that *E. coli* does not elongate the palmitic acid aliphatic chain. As seen in Table 3.1, unsaturated FA chains in phospholipids are mostly palmitoleic and oleic acid, with a saturated/unsaturated (S/U) FA chain ratio of 36:64 in unlabeled bacteria comparatively to 83:17 after PA-d₃₁ enrichment.

Table 3.1 Fatty acid composition of the membranes of labeled and unlabeled non-mutated *E. coli*.

<i>E. coli</i> sample	% fatty acid (w/w)				
	C16:0	C16:0D	C16:1	17:1	18:1
Labeled	7%	76%	9%	1%	7%
Unlabeled	36%	0%	28%	3%	33%

To verify if our membrane lipid deuteration procedure affects the viability of the bacteria, cellular viability was determined after harvest, but also before and after ²H-SS-NMR experiments. This allowed ascertaining if *in vivo* SS-NMR analysis of membrane perturbations was accomplishable with these newly developed membrane-deuterated wild-type *E. coli*. As can be seen in Table 3.2, cellular viability at harvest is rather similar to that of unlabeled cells. Application of the rinsing and pelleting steps possibly affects the cells as the MTT reduction activity is lowered to 78% of the value at harvest. Nevertheless, the washing procedure allows cells to be viable at the start of the NMR experiment, thus enabling *in vivo* analysis. Some cells die during the static NMR study as the MTT reduction activity diminishes to 42% (Table 3.2). Still, a significant portion of the bacteria remains alive during the 2-hour analysis. Finally, we have also evaluated the effect of the antimicrobials on the bacteria after ²H-SS-NMR analysis. Table 3.2 shows that CTAC has a greater impact on the cellular viability than PxB, fullerenol and the marennine-like pigment when used at similar

concentrations (estimated to 1-5% w/w). Only 4% of the bacteria survive to the addition of the detergent, as opposed to ~24% in the case of the antibiotic, nanoparticles and extracellular marennine-like pigment.

Table 3.2 MTT reduction activities of labeled *E. coli* after exposition to antimicrobials with percentage compared to cells at harvest after rinsing.

Analysis	MRU/(mL OD ₆₀₀)	
	Labeled	Unlabeled
At harvest	74.8 ± 29.2	68.2 ± 17.3
After rinsing	58.5 ± 27.1	---
After NMR		
<i>no antimicrobials</i>	24.3 (42%)	---
+ <i>PxB</i>	13.8 (24%)	---
+ <i>fullerenol</i>	14.0 (24%)	---
+ <i>CTAC</i>	2.6 (4%)	---
+ <i>InP</i>	24.1 (41%)	---
+ <i>Exp</i>	14.0 (24%)	---

3.5.2 Characterization of intact *E. coli* cells

Characterization of the membrane lipids was carried out by studying the thermotropic behavior of the intact labeled *E. coli* cells by ²H-SS-NMR. Phospholipids in a bacterial membrane are in a liquid-crystalline phase and undergo a fast rotation along their longitudinal axis. The quadrupolar splitting ($\Delta\nu_Q$) observed on the SS-NMR spectrum for a deuterium nucleus in the lipid acyl chain will depend on its orientation with respect to the magnetic field direction, but also on the location of the C-²H bond on the chain which ordering decreases when going from the positions near the headgroup to the terminal C²H₃. For a C-²H bond in a phospholipid bilayer with axial symmetry:

$$\Delta\nu_Q(\delta) = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} (3 \cos^2 \theta - 1) S_{C^2H} \quad (3.1)$$

where (e^2qQ/h) is the quadrupole coupling constant (~167 kHz), θ is the angle between the bilayer normal and the lipid long axis, and S_{C^2H} is the order parameter of a deuterium bond vector (Davis, 1983 ; Seelig et Seelig, 1980). Typically, the positions located in the first half of the phospholipid chain have a similar degree of ordering and form a plateau-like feature on the spectra.

The spectra acquired at 12, 37 and 55°C are shown in Figure 3.1 and the spectral moment analysis is displayed in Table 3.3. Figure 3.1(a) shows that at 12°C the spectrum is mostly typical of membrane lipids in mixed gel and liquid-crystal phases. The largest quadrupolar splitting has a value of 125 kHz similarly to perdeuterated dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC-d₆₂) in the gel phase (Davis, 1979 ; Davis *et al.*, 1979). At about ±30 kHz, another population of phospholipids in the gel phase is identified. From previous work, it could be ascribed to phospholipids with more chain disorder (Davis, 1979 ; Davis *et al.*, 1979). Evidence for lipids in a fluid phase is revealed by a shoulder at approximately ±25 kHz. A $\Delta\nu_Q$ value of 2 kHz is attributed to the terminal methyl groups. As previously observed on *E. coli* membranes (Davis *et al.*, 1979), a feature with a $\Delta\nu_Q$ of 15 kHz is visible on the spectrum. Called "feature X", it has been associated with bacteria degradation. This feature is present at all temperatures but is smaller at lower temperatures and when analyses are done on fresh samples.

Table 3.3 Spectral moment analysis of the ²H-SS-NMR spectra of labeled *E. coli* obtained at different temperatures.

Temperature (°C)	M ₁ (10 ⁴ s ⁻¹)	M ₂ (10 ⁹ s ⁻²)	Δ ₂
12	11.0	21.2	0.30
37	6.3	9.0	0.68
55	3.8	3.3	0.69

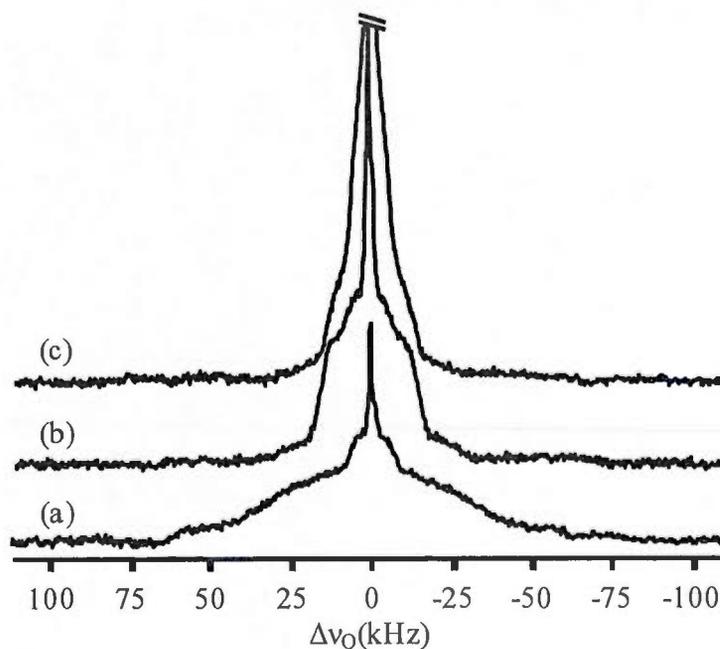


Figure 3.1 ^2H -SSNMR spectra of intact non-mutated *E. coli* acquired at (a) 12, (b) 37 and (c) 55°C. The top of spectrum (c) is truncated.

As the temperature is increased to 37°C, the contribution of phospholipids in the gel phase ($\Delta\nu_Q$ of ~ 60 kHz) is very small Figure 3.1(b). The signal of phospholipids in the liquid crystalline phase produces a characteristic spectrum presenting the well-defined edges of a plateau which has a quadrupolar splitting of 25 kHz. When heating the bacteria sample to higher temperatures (Figure 3.1(c)), this value slightly decreases due to increased motional averaging, consistent with other work (Davis, 1979). At 37°C the quadrupolar splitting of the terminal methyl group (2 kHz) corresponds to previously reported values of *E. coli* biomembranes in a lamellar liquid crystalline phase (Davis *et al.*, 1979). At 55°C, the gel phase is almost absent. Most phospholipids are in a fluid phase but the plateau is barely distinguishable due to the considerable contribution of feature X to the spectrum. Therefore bacteria alteration seems to dominate at high temperatures. Finally, an isotropic signal is present on all spectra and corresponds to traces of deuterated water (Davis *et al.*, 1979).

Examination of the spectral moments shows that M_1 decreases when heating the bacteria samples from 12 to 55°C consistent with a concomitant increase in phospholipid acyl

chain disorder as seen when pure phospholipid bilayers undergo a gel-to-liquid crystalline phase transition (Davis, 1979). M_2 reflects the correspondent smaller spectral width. The increase in Δ_2 value with *E. coli* sample temperature suggests that more lipid phases coexist when increasing the temperature, e.g. a gel and a fluid phase at 37°C. However the calculation of the Δ_2 value which should be smaller for the *E. coli* membranes in the fluid phase at 55°C is most likely biased by the large contribution of feature X.

3.6 Effect of antimicrobial agents on intact *E. coli* cell membranes

The response of the membrane-deuterated non-mutated *E. coli* to antimicrobials has been tested using various molecules with different action mechanisms. More specifically, the cationic lipopeptide polymyxin B (PxB) is an antibiotic known to affect the bacterial membrane permeability by causing its breakage (Clausell *et al.*, 2003 ; Nelson *et al.*, 2009). Fullerenol is a hydrosoluble nanoparticle that would preferentially interact with negatively-charged phospholipids (PG) and fluidify the bilayer without leading to membrane rupture, as was observed in model bacterial membranes (Brisebois *et al.*, 2012). Finally, cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) is suspected to interact with the polar heads of PGs in *E. coli* membranes similarly to CTABromide which was shown to restrain phospholipids motions (Beyer, 1986).

Figure 3.2 shows the spectra obtained at 37°C after exposition of freshly harvested ^2H -labeled *E. coli* to these different antimicrobial agents. First, the addition of PxB to pelleted cells (~1% w/w of dry bacteria) induces the formation of a gel phase as revealed by the large intensity at ± 60 kHz (Figure 3.2(b)). A plateau is also seen on the spectrum with a corresponding $\Delta\nu_Q$ value of 25 kHz similar to that of the unexposed cells. This confirms the presence of phospholipids in a fluid phase. Calculation of the first spectral moment in Table 3.4 is indicative of an overall decrease in the lipid chain motions since M_1 increases from 6.3 to $7.1 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ when PxB is added to the bacteria milieu. The coexistence of a fluid and a gel phase is demonstrated by the spectral shape (higher M_2 value) and distribution of quadrupolar splittings with Δ_2 of 0.64 consistent with a “heterogeneous” membrane (Davis, 1979).

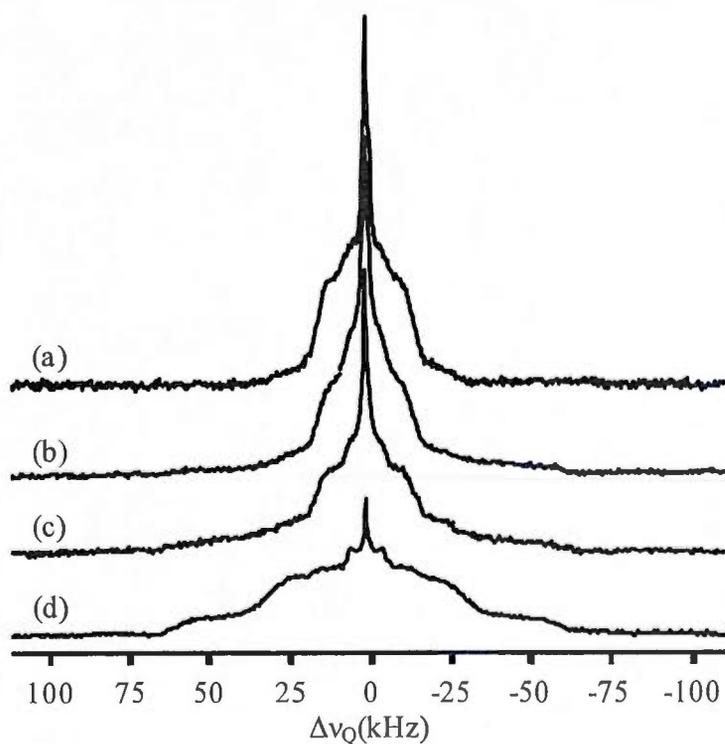


Figure 3.2 ^2H -SS-NMR spectra of (a) intact non-mutated *E. coli* acquired at 37°C and in the presence of (b) PxB, (c) fullerénol and (d) CTAC.

Table 3.4 Spectral moment analysis of the ^2H -SS-NMR spectra of labeled *E. coli* obtained in the presence of different antimicrobials.

Temperature ($^\circ\text{C}$)	M_1 (10^4 s^{-1})	M_2 (10^9 s^{-2})	Δ_2
None	6.3	9.0	0.68
PxB	7.1	11.2	0.64
fullerénol	9.9	19.9	0.50
CTAC	12.7	25.5	0.17
InP	5.5	5.1	0.25
ExP	9.3	17.1	0.46

Figure 3.2(c) shows that the addition of fullerénol to the bacteria ($\sim 5\%$ w/w of dry bacteria) has more effect than PxB on *E. coli*'s ^2H -SS-NMR spectrum lineshape. The gel phase with a $\Delta\nu_Q$ of about 120 kHz has a greater contribution to the spectrum while the intensity of both the plateau and feature X are reduced. The quadrupolar splittings of the

plateau (25 kHz) and methyl regions (2 kHz) are similar to those of unexposed cells, suggesting that fulleranol does not affect the acyl chains of the lipids in the fluid portion of the membrane. The increased proportion of lipids in a gel phase induced by the presence of the $C_{60}(OH)_{24}$ nanoparticles is better evidenced by the calculation of the spectral moments in Table 3.4. With fulleranol, both M_1 and M_2 values are higher than for “pure” *E. coli* (bacteria without antimicrobial), and the smaller Δ_2 value suggests a smaller distribution of chain ordering - i.e. more homogeneity - in the *E. coli* membranes.

Deuterated bacterial cells were also exposed to the detergent CTAC (~1% w/w of dry bacteria) and Figure 3.2(d) reveals significant changes in the *E. coli* 2H -SS-NMR spectrum. More specifically, an important fraction of the phospholipids are in a gel phase ($\Delta\nu_Q \sim 120$ kHz) with reduced mobility, similarly to what was observed in “pure” *E. coli* samples at low temperature. A shoulder with $\Delta\nu_Q$ of about 60 kHz suggests a phospholipid population in a gel phase characterized by more chain disorder. A plateau region is still observable on the spectrum at ± 12.5 kHz, though, indicating that some phospholipids are still found in a fluid phase. Table 3.4 shows that the M_1 value calculated for the spectrum of CTAC-exposed bacteria is the highest ($12.7 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$) when compared to the other antimicrobials, indicating that the phospholipids’ acyl chains are globally more ordered due to the presence of the cationic detergent. The high M_2 reflects the dramatic spectral changes and the Δ_2 value of 0.17 illustrates the narrower distribution of quadrupolar splittings consistent with a greater proportion of lipids in a gel phase and less in the fluid phase. Altogether, these results indicate that exposition to CTAC greatly rigidifies *E. coli* membranes. A small isotropic peak is seen on the spectrum and can be ascribed either to traces of deuterated water or to fast-tumbling objects.

Finally, we have exploited the phospholipid deuteration protocol that we have established to determine by 2H -SS-NMR on intact *E. coli* the effect of the blue pigment produced by the Mediterranean diatom *H. provincialis* shown in Figure 3.3. This pigment is similar to marennine which is produced by *H. ostrearia* (Gastineau, 2011). Marennine, like other similar pigments from blue diatoms, is a natural bioactive molecule which displays antimicrobial activity, but its action mechanism and chemical structure are still unknown (Mouget *et al.*, 2005). We have more specifically studied the intra- (InP) and extracellular

(ExP) forms of the marennine-like blue pigment. The intracellular form is easily seen in Figure 3.3 in the apical zones of *H. provincialis*.

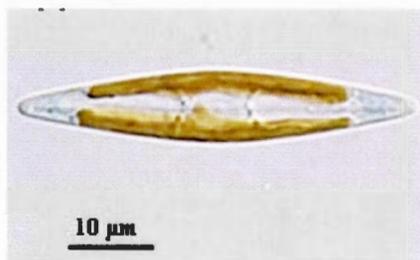


Figure 3.3 Optical microscopy image of *Haslea provincialis* with blue apices (intracellular form of the marennine-like pigment).

Figure 3.4(b) shows the ^2H SS-NMR spectrum of membrane-deuterated *E. coli* obtained in the presence of the pigment's intracellular form. Although similar to the spectrum of pure bacteria (Figure 3.4(a)), the spectral moment analysis reported in Table 3.4 reveals a lower M_1 value (5.5 compared to 6.3) typical of a slight decrease in phospholipid acyl chain order induced by the interaction of InP with the bacterial membranes, with a lower M_2 corresponding to a smaller spectrum width. The decrease in Δ_2 value suggests less phase heterogeneity. InP has little effect on the bacteria viability, as revealed in Table 3.2 with an MRU similar to cells with no antimicrobials that most likely suffer from nutrient privation during the NMR analysis (Pius, Morrow et Booth, 2012).

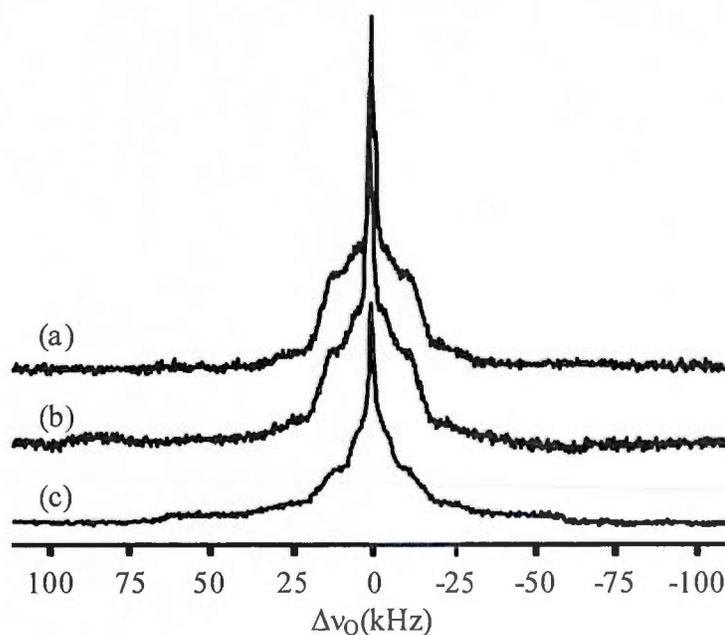


Figure 3.4 ^2H -SS-NMR spectra of (a) intact non-mutated *E. coli* acquired at 37°C and in the presence of b) intracellular and (c) extracellular forms of the marennine-like pigment from *H. provincialis*.

Interestingly, the effect of the extracellular form of the marennine-like pigment on *E. coli* membranes is very different and resembles that of fullereneol (Figure 3.2(c)). As for the polyhydroxylated fullerene nanoparticles, ExP increases the proportion of phospholipids in a gel phase and the plateau feature indicates that some phospholipids remain in a fluid environment. The similarity between the effect of fullereneol and ExP is better evidenced by comparing the first and second spectral moments in Table 3.4 which are nearly identical, with M_1 and M_2 values higher than those of “pure” bacteria. The lower Δ_2 compared to “pure” *E. coli* suggest that the lipid acyl chains are globally more ordered by the presence of ExP. The cell viability is also comparable (24%) for ExP and fullereneol (Table 3.2).

3.7 Discussion

3.7.1 Successful ^2H labeling of wild-type *E. coli* membranes

We have exploited *E. coli*'s machinery to deuterate the membrane phospholipid chains of *E. coli* without making any use of mutations. This was done by growing bacteria in a medium enriched in deuterated palmitic acid which is the most abundant phospholipid FA

chain found in *E. coli*, representing up to 45% of total lipids depending on the growth temperature (Mavis et Vagelos, 1972 ; Morein *et al.*, 1996 ; Silbert, Ruch et Vagelos, 1968). A 76% deuteration of the phospholipid FA chains was achieved in the bacterial membranes (Table 3.1). This labeling value is close to what was attained for wild-type *E. coli* (88%) using a similar protocol and radioactive (^3H , ^{14}C) labels (Sinensky, 1971) but is greater than what was previously reached with the auxotrophic *E. coli* L51 strain (50%) deficient in FA synthesis and oxidation (Davis *et al.*, 1979). It compares well with a previous study on the L8 strain (Pius, Morrow et Booth, 2012) assessing that 96% of the PE acyl chains are deuterated. This would correspond to a labeling percentage of 72% considering that PE represents 75% of *E. coli*'s cell membrane phospholipids.

The high energetic cost of FA biosynthesis by the bacteria favors the uptake of exogenous long-chain FAs (12 to 18 carbon atoms) which bind to the *fadL* protein located within the bilayer of the outer membrane. FAs then travel through the periplasm by protein-mediated transport to reach the cell inner membrane where they are transferred to acyl-CoA in the cytoplasm. There, they can either be degraded via β -oxidation or incorporated into phosphatidic acid by the glycerol-3-phosphate acyltransferase to be later converted into the different phospholipids present in *E. coli* (Byers et Shen, 2002 ; Jiang et al., 2010 ; Zhang et Rock, 2008). Therefore, the incorporation of exogenous PA-d₃₁ is expected to occur in all types of phospholipids equivalently. Only a minor proportion of exogenous FAs can incorporate directly into PE via an acyl carrier protein (ACP) to result in selective deuteration of PE (Byers et Shen, 2002). These pathways, thus, favor the use of exogenous FAs in the phospholipids' synthesis and do not allow accumulation of free FAs inside the bacterial cells (Zhang et Rock, 2008).

As presented in Table 3.1 phospholipids of *E. coli* with or without ^2H enrichment are constituted mainly from palmitoleic and oleic acid, in accordance with the literature (Davis *et al.*, 1979 ; Ivancic *et al.*, 2009 ; Kobayashi *et al.*, 1980 ; Nichol *et al.*, 1980 ; Rietveld *et al.*, 1993 ; Shaw et Ingraham, 1965 ; Sinensky, 1971 ; Smith, Snyder et Harden, 1995). As observed in other studies using mutated strains (Davis *et al.*, 1979 ; Mansilla *et al.*, 2004), our FAME analysis shows that PA-d₃₁ is the only type of deuterated FA chain detected. The elongation of the deuterated palmitic acid chains was not expected because exogenous FAs in

E. coli have no access to the biosynthetic acyl intermediates provided by the ACP involved in the FA elongation but also in the biosynthesis of lipid A (Byers, 1989 ; Byers et Shen, 2002). Therefore LPS cannot be deuterated. The S/U FA ratio (Table 3.1) has considerably increased following the deuteration diet of the bacteria, as already observed in literature (Davis *et al.*, 1979 ; Nichol *et al.*, 1980). The smaller proportion of hydrogenated palmitoleic and oleic acid in the phospholipids in labeled cells indicates that the bacteria have proportionally reduced the *de novo* synthesis of these FAs to compensate for the intake of exogenous PA-d₃₁ (Esfahani, Ionedo et Wakil, 1971 ; Weber *et al.*, 2001). This higher level of saturated FAs in phospholipids indicates a decrease in membrane fluidity - a mechanism generally observed during temperature change adaptation (Weber *et al.*, 2001). However, as the MTT reduction activities are similar between labeled and unlabeled bacteria at harvest (Table 3.2), the changes observed seem not to have an impact on cellular viability at 37°C. The possibility to reach high phospholipid deuteration levels with non-engineered *E. coli* has important experimental advantages such as the easy availability of the bacteria and the near-natural membrane labeling that leads to more native-like *in vivo* studies. Therefore, the use of mutant strains is unnecessary.

3.8 ²H-SS-NMR analysis of intact *E. coli* membranes and response to antimicrobials

Model bacterial membranes are generally employed to investigate the action mechanism of membrane-targeting antimicrobial agents and peptides (Strandberg et Ulrich, 2004). The very few ²H-NMR studies carried out on intact *E. coli* cells were performed on mutated strains deficient in total FA biosynthesis (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012). The membrane-deuterated non-engineered *E. coli* developed in this work demonstrate a high level of cellular viability before (75%) and after (50%) the NMR experiment, confirming the *in vivo* nature of the analyses. Characterization of the intact *E. coli* cells by ²H-SS-NMR from 12 to 55°C in Figure 3.1 shows the disappearance of a gel phase and a higher proportion of phospholipids in the liquid-crystal phase when increasing the temperature. This membrane behavior presents a lot of concordance with a previous ²H-SS-NMR study of labeled mutated *E. coli* (L51 strain) (Davis *et al.*, 1979). Using ²H-SS-NMR, Davis *et al.*, 1979 showed that the orientational order in the phospholipid acyl chain is greater in the outer membrane of *E. coli* comparatively to the cytoplasmic membrane. The gel-to-

liquid crystalline phase transition temperature was shown to be 7°C higher for the outer membrane. When compared to these studies on outer and inner *E. coli* membrane extracts (Davis *et al.*, 1979), the spectra obtained in our work appear to be the sum of the signals of lipid in both membranes.

We have then evaluated the efficiency of the deuterated non-mutated *E. coli* to examine the action mechanism of antimicrobial agents by ²H-SS-NMR. This was done by exposing labeled bacteria to different molecules with known deleterious effects on bacteria, i.e. an antibiotic, a nanoparticle and a detergent. First, the cationic lipopeptide PxB is known to have a high efficiency against Gram(-) bacteria such as *E. coli* and its action mechanism is well documented (Clausell *et al.*, 2003). Via electrostatic interactions, polymyxins are believed to bind to LPS in the outermost leaflet of the outer membrane. PxB competes with divalent cations that cross-bridge LPS molecules and this perturbation enables its penetration into the periplasm to reach its target - the cytoplasmic membrane - that can then be permeabilized by PxB's FA chain (Clausell *et al.*, 2003).

The insertion of PxB in *E. coli* membranes is proven on intact bacteria in our study. The ²H-SS-NMR spectrum reveals a higher proportion of phospholipids in a gel phase when bacteria are exposed to PxB. This result is in agreement with previous studies suggesting that at PxB concentration (> 2 mol%) the antibiotic reaches the inner membrane and increases its lipid packing due to the insertion of the lipid tail (Delcour, 2009). This is what we observe *in vivo* for PxB which concentration is most likely superior to 3 mol% considering that ~1% antibiotic (w/w) was used. Because the cellular viability falls to 17% in the presence of PxB, it is possible that bacteria are lysed by the presence of the antibiotic, but a possible isotropic resonance would be obscured by the presence of degraded bacteria indicated by feature X.

The responsiveness of the non-mutated *E. coli* to antimicrobials is further demonstrated with fullereneol. These nanoparticles are reported to have smaller antibacterial activity than non-functionalized fullerene and would inhibit cell growth (Aoshima *et al.*, 2009 ; Gelderman *et al.*, 2008). We observe that *E. coli*'s viability is diminished to 21% by the fullereneol interaction at the concentration studied which is superior to that used in a previous work (Aoshima *et al.*, 2009). Comparison of the ²H-SS-NMR spectra for the intact cells with and without fullereneol indicates an increased proportion of lipids in a gel phase. It should be

noted that this result differs to what we had previously observed by NMR and infrared spectroscopy on DPPC/DPPG (dipalmitoyl-phosphatidylglycerol) bilayers used to mimick bacterial membranes. Indeed, lipid segregation was seen as well as a disordering effect solely on DPPG acyl chains in the presence of 5 mol% fullereneol (Brisebois *et al.*, 2012). This effect was ascribed to a preferential affinity of polyhydroxylated fullerene for DPPG's hydroxyl group (Brisebois *et al.*, 2012). The outer membrane of *E. coli* comprises LPS that offer several hydroxyl groups for fullereneol to interact, and Aoshima *et al.*, 2009 showed that the bactericidal effect of polyhydroxylated fullerene on different bacterial strains was correlated to the number of OH groups on the nanoparticles, suggesting an interaction with the peptidoglycan on Gram(+) bacteria. Therefore, the increased proportion of phospholipids in a gel phase in *E. coli* membranes showed in our study by ^2H -SS-NMR can be ascribed to an interaction of the $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ nanoparticles with LPS at the bacteria surface. This most likely induces a tighter packing of the phospholipids in the outer leaflet of the outer membrane, leaving the more fluid cytoplasmic membrane intact and in a fluid phase (Davis *et al.*, 1979). Our results outline the importance of comparing SS-NMR analyses on intact cells with studies on model membranes which are very useful to investigate specific interactions or phenomena.

The effect of the antimicrobial agent CTAC is successfully evidenced with intact non-mutated *E. coli*. CTAC is a cationic antimicrobial detergent which action mechanism is most likely to disrupt the bacterial membrane and induce cell leakage (Ahlström *et al.*, 1997). The action mechanism of CTAC and CTABromide on Gram(-) bacteria is not fully known but would most likely be concentration-dependent (Salt et Wiseman, 1970). A study on Gram(-) *Proteus mirabilis* revealed that membrane fluidity is increased by the action of surfactants but that membrane fluidity could not be correlated to biocidal activity (Glover *et al.*, 1999). Electrostatic interactions are believed to be responsible for the effect of quaternary ammonium compounds (QACs) on membrane lipids (Marcotte, Barbeau et Lafleur, 2005). ^{31}P and ^2H -SS-NMR investigation on DPPC vesicles showed that CTAB restricted the lipid headgroup movement (Beyer, 1986); however a thermodynamics study showed that hydrophobic effect is important in the interaction of CTAC with dioleoyl-PC (DOPC) bilayers and that long-chain QACs are more efficient to decrease the membrane permeability (Marcotte, Barbeau et Lafleur, 2005). The phase diagram for CTAB in dimyristoyl-PC

(DMPC) shows that the formation of mixed micelles occurs only at high (1.5:1) detergent/lipid molar ratio (Almgren, 2000). Similarly, membrane disruption by CTAC is observed a detergent/lipid ratio superior to 1 for DOPC vesicles (Marcotte, Barbeau et Lafleur, 2005).

With the CTAC concentration of 1% w/w used in this work, the *E. coli* ^2H -SS-NMR spectrum and moment analysis are strongly suggestive of membrane rigidification with phospholipids predominantly in a gel phase. Most of the cells died due to exposition of CTAC since cellular viability falls to about 5%. The spectrum indicates little or no formation of fast-tumbling structures such as mixed micelles, therefore membrane disruption is not observed at the CTAC concentration studied. We believe, thus, that cell death is ascribed to the lack of membrane fluidity and subsequent loss of important biochemical functions, for example those performed by membrane proteins. Considering the cationic nature of CTAC, it is very likely that the detergent molecules interact electrostatically with the negatively-charged PG found in the bacteria's outer and inner membranes. CTAC hydrophobic chain would be inserted into the lipid bilayer, thus restraining the lipid acyl chain movements and inducing the formation of a gel phase. This result contrasts to the increased fluidity of *P. mirabilis* membranes in the presence of amine oxide (Glover *et al.*, 1999), but can be explained by the absence of an apolar chain on this small amphiphilic surfactant. Our results agree with Marcotte, Barbeau et Lafleur, 2005 who proposed that hydrophobic interactions would be involved in the action mechanism of QACs.

Finally, the deuteration protocol for the membrane lipids of non-mutated *E. coli* allowed investigating the effect of the intra- and extracellular forms of the marennine-like pigment produced by the marine diatom *H. provincialis* for which no action mechanism is proposed yet. According to the ^2H -SS-NMR spectra (Figure 3.4) InP has a slight disordering effect on bacterial membranes while the effect of ExP is quasi identical to that of fulleranol. More specifically, the bacteria spectrum is characterized by a greater contribution of lipids in the gel phase as compared to the fluid phase. According to preliminary characterization (Pouvreau *et al.*, 2006a), marennine is a 10 kDa non-hydrolysable polyphenolic molecule, and the pigment produced by *H. provincialis* is similar to marennine, as evidenced by *in vivo* UV-visible spectrophotometry and Raman spectroscopy (Gastineau, 2011). Therefore as for

fullerenol, ExP would exert its antibiotic action by interacting with LPS on *E. coli* surface where this location would restrain the phospholipids motion. Although both forms of marennine are not strong antibiotics against terrestrial pathogens (Gastineau *et al.*, 2012b), our results demonstrate that the marennine-like pigment produced by *H. provincialis* does interact with *E. coli* membranes and that the extracellular form is more deleterious than the intracellular one. To a larger extent, these results also provide valuable information on their interaction with Gram(-) bacteria. They also suggest that the structure of the intracellular form is significantly different to that of the extracellular form to present another action mechanism on *E. coli* membranes.

3.9 Conclusion

A protocol to deuterate membrane phospholipids in non-engineered *E. coli* was successfully established by exploiting their natural lipid biosynthesis pathway and using perdeuterated exogenous palmitic acid. These bacteria which do not require genetic modification have the advantage of being readily available and showed a deuteration level comparable to that of fatty-acid auxotrophs. The signal-to-noise ratio of the ^2H -SS-NMR spectra allowed studying the interactions of PxB, fullerenol, CTAC and marennine-like pigments on intact bacteria in native-like conditions. The action mechanism of PxB by lipid tail insertion into *E. coli* membranes was proven experimentally. We were also able to demonstrate that membrane rigidification can play a role in the biocide activity of the detergent CTAC. The availability of membrane-deuterated bacteria was shown to be important in cases where the antibiotic action of molecules relies on the interaction with lipopolysaccharides that are not used in model membranes. This was demonstrated with polyhydroxylated molecules, i.e. fullerenol nanoparticles and a bioactive pigment produced by a blue diatom from the genus *Haslea*. A difference was observed between the interaction of fullerenol with intact *E. coli* and model DPPC/DPPG membranes by ^2H -SS-NMR, stressing the complementarity of the two approaches. Finally, we were able to detect a different perturbation of the bacteria membranes by the intra- and extracellular forms of a marennine-like microalgal blue pigment, thus providing valuable information on their action mechanism and suggesting structural differences.

3.10 Acknowledgements

CTL wishes to thank the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and the *Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT)* for the award of scholarships. She would like to thank S. Manrao, the *Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP)* and the *Réseau Aquaculture Québec (RAQ)* for travel awards. M. Babin (ISMER, Université du Québec à Rimouski) and S. Jenna (Université du Québec à Montréal) is acknowledged for technical assistance. This work was supported by the NSERC and the Canadian Foundation for Innovation (CFI). IM is a member of the GRASP and the RAQ.

CHAPITRE IV

EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DU PIGMENT MARENNINE

DE DIATOMÉES DU GENRE HASLEA

Ce chapitre porte sur un projet effectué durant un stage en France d'octobre à décembre 2010 qui permet d'extraire les pigments algaux de type marennine de diatomées du genre *Haslea* et de tester leur cytotoxicité et leur effet antiviral. Les expériences ont été effectuées par l'auteure à moins d'indications contraires.

4.1 Introduction

Les huîtres constituent le deuxième groupe d'espèces marines le plus cultivé dans le monde avec une production de plus de 4 millions de tonnes (FAO, 2009). Avant leur mise en marché, les huîtres passent généralement par une étape appelée affinage, où elles acquièrent les caractéristiques désirées (taille, forme, goût, etc.) avant la vente. Cette étape est réalisée durant quelques semaines dans des zones d'eau salée peu profonde ayant de faibles échanges avec la mer, appelées claires. Dans certaines régions de la France (baie de Marennes-Oléron) qui est le plus grand producteur européen d'huîtres, cet affinage se distingue par le verdissement des huîtres qui est présenté comme une valeur ajoutée au produit. La figure 4.1 démontre la coloration verte des branchies d'huîtres de *Crassostrea gigas*. Les branchies passent de jaune à vert suite à la fixation d'un pigment bleu produit par la diatomée *Haslea ostrearia* qui colore l'eau des claires. En 1886, Lankester a nommé ce pigment « marennine » pour son rôle dans le verdissement des huîtres de la région de Marennes-Oléron (Robert *et al.*, 2002).

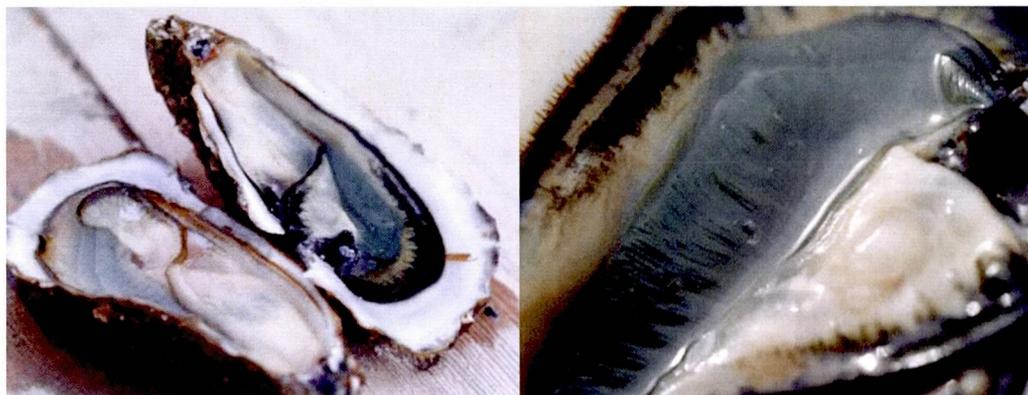


Figure 4.1 Huîtres (*Crassostrea gigas*) ayant des branchies vertes récoltées chez l'ostréiculteur EARL Bonnain à L' Houmeau, France dans la baie de Marennes-Oléron. La photo a été prise par Jean-Luc Mouget en 2010 à l'aide d'un appareil photo Olympus E-500, 50 mm et un objectif ED Macro. Adapté de Mouget, 2010.

H. ostrearia, qui est une diatomée benthique, accumule la marennine dans les régions apicales des cellules. Lors de sa croissance, la diatomée rejette la marennine dans le milieu environnant, ce qui colore l'eau des claires en bleu. Ainsi, la marennine existe sous deux formes : interne et externe (Pouvreau *et al.*, 2006b).

Le phénomène de verdissement d'huîtres et l'observation de diatomées bleues ont été constatés dans différentes régions du monde. Par contre, dans la majorité des cas, aucune étude poussée n'a été effectuée pour identifier précisément l'espèce. Dans un cas, une nouvelle espèce de diatomée bleue a été identifiée, *Haslea karadagensis*, isolée à partir des berges rocheuses de la réserve naturelle de Karadag en Crimée, Ukraine (Gastineau *et al.*, 2012a). Ainsi, des diatomées bleues semblables à *H. ostrearia* semblent être distribuées mondialement. La figure 4.2 illustre différentes espèces d'*Haslea karadagensis* est visiblement plus petite et large que *H. ostrearia* et d'*H. provincialis*, une souche prélevée dans la Méditerranée, à Saint Raphaël, France (Gastineau, 2011).

H. karadagensis est visiblement plus petite et large que *H. ostrearia* et d'*H. provincialis*, une souche prélevée dans la Méditerranée, Saint Raphaël, France (Gastineau, 2011). De plus, son pigment est plus foncé et grisâtre.

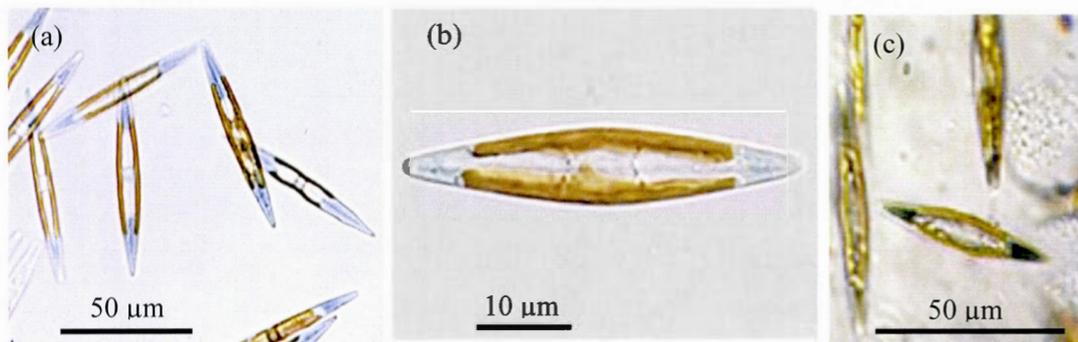


Figure 4.2 Images prises par microscope optique de différentes souches de diatomées bleues soient (a) *H. ostrearia*, (b) *H. provincialis* et (c) *H. karadagensis*. Adapté de Gastineau, 2011 ; Mouget, 2010.

Chez l'algue, ce pigment ne semble pas être photosynthétique mais plutôt photoprotecteur (Pouvreau *et al.*, 2006b). Il permettrait à *Haslea ostrearia* d'incommoder les microorganismes compétiteurs par effets allélopathiques (Pouvreau *et al.*, 2007a) et en filtrant la lumière des claires (Gastineau *et al.*, 2012b ; Turpin *et al.*, 2001). La marennine présente des propriétés biologiques intéressantes favorisant la biovalorisation potentielle de la diatomée *H. ostrearia*. Des extraits bruts analysés *in vitro* ont présenté une activité antivirale et anticoagulante (Bergé *et al.*, 1999) ainsi qu'une activité antiproliférante et antitumorale (Carbonnelle *et al.*, 1999). Les extraits purs de marennine montrent une activité antibactérienne (Gastineau *et al.*, 2012b) et antioxydante (Pouvreau *et al.*, 2008). Ainsi, plusieurs études ont porté sur la synthèse de la marennine et il a été trouvé que la qualité de la lumière (Mouget *et al.*, 2005 ; Mouget *et al.*, 1999) était un facteur important.

Récemment, une méthode d'extraction et purification des deux formes de marennine a été publiée (Pouvreau *et al.*, 2007b ; Pouvreau *et al.*, 2006b). La caractérisation préliminaire de la marennine indique une masse moléculaire autour de 10 kDa et la structure chimique semble être polyphénolique et polyanionique sous une vaste gamme de pH, ce qui la rend très hydrosoluble, toutefois la structure exacte reste encore inconnue (Pouvreau *et al.*, 2006a). Les polyphénols sont des composés connus pour interagir avec les membranes bactériennes (Nakayama, Kaiya et Kumazawa, 2006). Ainsi, il est possible que les propriétés allélopathiques de ce pigment soient basées sur des mécanismes de perturbation des membranes cellulaires des microorganismes compétiteurs.

4.2 Hypothèses et objectifs

Les objectifs du stage sont d'améliorer la production (quantité et qualité) du pigment marennine chez *Haslea provincialis* et chez *Haslea karadagensis* par modification de l'intensité lumineuse. Le projet a également pour but de déterminer les propriétés antivirales et cytotoxiques des pigments internes et externes. Nos hypothèses sont que les formes internes et externes de ce pigment induisent des effets allélopathiques différents.

4.3 Matériel et Méthode

4.3.1 Produits utilisés

Les produits utilisés dans le cadre de ce stage étaient au minimum de qualité établie par l'American Chemical Society (ACS). Les sels inorganiques composant le milieu de culture d'eau de mer artificielle (ASW), le rouge neutre, l'acide citrique, l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de sodium proviennent de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) ou de Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, Bas-Rhin, France). Le tampon phosphate salin (PBS) et le sérum physiologique proviennent de chez Eurobio (Friesoythe, Allemagne).

4.3.2 Culture des diatomées bleues

La souche de diatomée bleue nommée Holbis isolée dans la Méditerranée à Saint-Raphaël, France (*H. provincialis*) et T1 isolée dans la mer Noire en Crimée, Ukraine (*H. karadagensis*) ont été fournies par Dr. Jean-Luc Mouget (Université du Maine, France). La culture des diatomées s'est faite dans des erlenmeyers stériles fermés à l'aide d'un bouchon de gaze et de ouate surmonté de papier d'aluminium. Les cultures ont été maintenues à 16 ± 1 °C et sous éclairage artificiel (tubes fluorescents Philips TLD 36W/965) avec une photopériode de 14 h : 10 h (jour : nuit.) La culture d'*H. provincialis* a été réalisée dans des erlenmeyers de 3 L avec 1 L de milieu de culture ASW (Mouget *et al.*, 2009) et dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 200 ml d'ASW pour *H. karadagensis*. La densité cellulaire a été mesurée en déposant une goutte de culture diluée sur un hémacytomètre de type Nageotte (Hausser Scientific, Horsham, États-Unis) et visualisée à l'aide du microscope inversé (Nikon Éclipse TS100, objectif H925, Lisses, Évry, France) sous un grossissement de 400x. Un minimum de 100 cellules a été compté dans des cases choisies au hasard. La taille moyenne des cellules a été déterminée en mesurant la longueur de 10 individus vivants

sélectionnés au hasard à l'aide de l'oculaire gradué et de la lame micrométrique Leitz Wetzlar de 2 mm graduée au dixième de millimètre.

4.3.3 Récupération des formes interne et externe des pigments de type marennine

Sous une hotte à flux laminaire (Telstar AH-100, Manouchian, Elancourt, France), les erlenmeyers ont été agités doucement pour mettre en suspension le biofilm formé. Environ 50 mL de la culture d'*H. provincialis* et 10 mL de la culture d'*H. karadagensis* ont été utilisés pour repiquer chacun des erlenmeyers aux 6 jours. Le reste des cultures a été centrifugé à 4 °C à 1000 rpm pendant 8 minutes à l'aide de la centrifugeuse Sigma Laborzentrifugen 3K15 de Bioblock Scientific (rotor 11133, Illkirch-Graffenstaden, Bas-Rhin, France). Le surnageant contenant la forme externe du pigment de type marennine a été récupéré et entreposé à 4 °C, et à -20 °C pour la biomasse contenant la forme interne ce qui minimise la dégradation des pigments en attendant leur récupération.

4.3.4 Extraction de la forme interne du pigment

20 à 30 g de biomasse congelée ont été transférée dans un grand mortier refroidi à l'azote liquide pour cryobroyage. Pour 1 g de biomasse, 5 g de tampon carbonate d'ammonium (NH_4HCO_3 250 mM pH 8) ont été ajoutés à la biomasse en poudre. L'extraction a eu lieu à température ambiante pendant 10 minutes. Le pigment extrait a été récupéré par centrifugation (15 minutes à 4 °C à 16500 rpm, Fisher Scientific, Bioblock, modèle 3K30, Illkirch-Graffenstaden, Bas-Rhin, France) où le surnageant a été récolté. La biomasse a été re-suspendue dans le tampon et a été ré-extraite jusqu'à ce que le tampon perde sa couleur, ce qui équivaut à un ratio final de 50:1 (volume de tampon : masse d'algues fraîches). Les débris d'algues ont été enlevés du surnageant par filtration différentielle sous vide à l'aide du système de filtration xx1004724 de Millipore (Molsheim, Bas-Rhin, France) et des préfiltres Watman C (Illkirch-Graffenstaden, Bas-Rhin, France) en microfibre de verre de 47 mm. Le filtrat a été entreposé à 4 °C pour éviter la dégradation du pigment.

4.3.5 Préfiltration du milieu de culture contenant la forme externe du pigment

Le surnageant a été filtré de façon différentielle pour éliminer les débris d'algues à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson Marlow 3B5), du support à filtre de Millipore de

142 mm (Inlet modèle YY3014230), des préfiltres Durieux puis des préfiltres AP15 de Millipore. Le filtrat a été entreposé à 4 °C.

4.3.6 Filtration à 30 kD, à 3 kDa et dessalage du pigment

Les formes externes et internes des pigments de type marennine préfiltrée ont été purifiées par filtration tangentielle à 30 kDa pour enlever les résidus qui auraient traversé le préfiltre. Une pompe péristaltique reliée à un contrôleur (Master Flex Modular controller model 7518-10 de Cole Palmer) a été utilisée pour maintenir la pression à 1,5 bar dans le système. Le système utilisé comprenant un support à filtre et une membrane de 6 pied² de cellulose régénérée (modèle PLTK30K de Millipore) a été rincé avec de l'eau distillée pour récupérer une plus grande quantité de pigment dans le filtrat.

Une filtration tangentielle de 3 kDa du filtrat a par la suite été appliquée pour concentrer et purifier le pigment qui a été retenue par la membrane de 2,5 pied² en cellulose régénérée (modèle PLBC3K). Le pigment a été récupéré en passant de l'eau distillée dans le flux tangentiel. Ces étapes de concentration et de dessalage ont été répétées jusqu'à ce que le pigment soit contenue dans 400 mL d'eau et présente une conductivité minimale de 1,5 mS (conductivimètre de type CDRV 62 de Tacussel électronique, Sanoma, CA, États-Unis).

4.3.7 Purification du pigment par chromatographie d'échange d'anions

Cette étape a été réalisée par l'utilisation d'une colonne composée de la phase stationnaire DEAE de Pharmacia HR16 pour échange d'anions faibles (25 mL de phase stationnaire) à laquelle un débit de 4 mL par minute a été maintenu par une pompe à piston alternatif (Waters modèle 510 de millipore). Le protocole d'élution suivant a été effectué sur la colonne pour la nettoyer.

10 minutes dans un tampon de trishydroxyméthylaminométhane (TRIS) de 25 mM

20 minutes dans un tampon TRIS de 25 mM à 0,2 M de chlorure de sodium (NaCl)

20 minutes dans un tampon TRIS de 25 mM à 0,8 M de NaCl

10 minutes dans un tampon TRIS de 25 mM à 1 M de NaCl

20 minutes dans un tampon TRIS de 25 mM

Le protocole a été répété une fois le pigment fixé sur la colonne. Ce dernier s'est décroché de la colonne à la troisième étape. La phase mobile à cette étape a donc été récupérée et entreposée à 4 °C.

4.3.8 Dessalage par dialyse et récupération par lyophilisation

Le pigment purifié a ensuite été dessalé par dialyse dans de l'eau ultrapure pendant 2 jours à l'aide d'une membrane Spectra en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 3,5 kDa (Spectrum, Breda, Pays-Bas). L'eau a été renouvelée jusqu'à l'obtention d'une conductivité inférieure à 1 mS et le pigment lyophilisé (Heto FD3 apparatus).

4.3.9 Culture des cellules Vero

La lignée CCL 81 de la souche ATCC de cellules Vero provenant des fibroblastes de rein de singe vert *Cercopithecus aethiops* a été fournie par le Dr. Nathalie Bourgougnon (Université Bretagne Sud, France). Les cellules ont été cultivées en continu dans 30 mL de milieu minimum essentiel d'Eagle (MEM) puis incubées à 37 °C sous atmosphère contenant 5 % de dioxyde de carbone (CO₂) et saturée en vapeur d'eau dans des flacons de 80 cm² pour former une monocouche. Les cellules se sont multipliées deux fois pour atteindre une concentration finale de 350 000 cellules/mL.

4.3.10 Lecture des plaques par coloration au rouge neutre

Les plaques de 96 puits ont été placées 45 minutes à 37 °C (incubateur Cellstar de Voilab, Saint-Herblain, France) après que 50 µL d'une solution de rouge neutre (0,15 g de rouge neutre dans 100 mL de sérum physiologique à pH 5.5 composée de 9 g/L de NaCl) aient été déposés dans chaque cupule. Les plaques ont été vidées puis les tapis cellulaires ont été rincés deux fois en ajoutant 100 µL de tampon PBS à pH 7,2. Le rouge neutre a été élué suite à l'ajout de 100 µL de tampon citrate-éthanol (50 : 50) et le tapis cellulaire resuspendu par aspiration et grattage à l'aide d'embout de pipette. L'absorbance de chaque cupule à 540 nm a été lue à partir du lecteur de microplaques (Packard Spectra Count de Bio-Rad). L'absorbance était directement proportionnelle au pourcentage de cellules viables. Le tampon citrate a été préparé à partir de 60,8 mL d'acide citrique (0,36 M dans NaOH 1N) et 39,2 mL d'acide chlorhydrique 0,1 N.

4.3.11 Tests de cytotoxicité et d'effet antiviral

La souche sauvage 17 du virus *Herpes simplex hominis* de type 1 (HSV-1) a été fournie par le Dr. Billaudel (Institut de Virologie de Nantes). Une suspension virale présentant du titre infectieux de $2 \times 10^{5.2}$ DI₅₀/mL et à une multiplicité d'infection de 0,01 DI₅₀/mL avec 350000 cellules/mL a été fournie par Christel Marty. Une solution de 25 mg/mL de Zovirax IV a été fournie par le Laboratoire Wellcome Ltd.

Les tests de cytotoxicité et d'effet antiviral ont été réalisés dans des microplaques de 96 puits. Un tapis cellulaire bien établi a été trypsiné puis repris dans 10 mL de milieu MEM supplémenté (8 % de sérum de fœtus de veau). Les cellules ont été diluées à 35 000 cellules par mL, et 100 µL de cette solution ont été ajoutés dans les cupules. 50 µL de solutions de différentes concentrations de pigment ont été ajoutés avant de compléter chaque puit à 200 µL à l'aide du milieu MEM supplémenté. Chaque concentration a été testée 4 fois. Les plaques ont ensuite été incubées 72 h dans une étuve à 37 °C avec 5 % de CO₂ sous atmosphère saturée en eau. L'effet cytotoxique a été déterminé visuellement au microscope puis par coloration au rouge neutre. L'effet antiviral a été déterminé de façon similaire à l'effet cytotoxique; 50 µL de la suspension ont été ajoutés aux cupules en plus des agents à tester. Des témoins cellulaires T_c (cupules contenant seulement les cellules) et des témoins virus T_v (cupules contenant seulement les cellules et le virus) étaient présents sur chaque plaque. Les données de cytotoxicité ont été exprimées en pourcentage de destruction (P_d) et calculées selon l'équation 4.1 tandis que l'effet antiviral a été calculé selon l'équation 4.2 sous forme de pourcentage de protection cellulaire (P_p) (Rashid *et al.*, 2009). DO_{test cyto.} est la densité optique de l'échantillon testé contenant l'agent et les cellules. DO_{contrôle} est la densité optique de cellules seules, DO_{témoin} est la densité optique de cellules exposées au virus, DO_{test viral} est la densité optique de l'échantillon testé contenant l'agent, les cellules et le virus.

$$P_d = 100 \times \frac{DO_{\text{contrôle}} - DO_{\text{test cyto.}}}{DO_{\text{contrôle}}} \quad (4.1)$$

$$P_p = 100 \times \frac{DO_{\text{test viral}} - DO_{\text{témoin}}}{DO_{\text{test cyto.}} - DO_{\text{témoin}}} \quad (4.2)$$

Les logarithmes en base dix de P_d et P_p en fonction de la concentration d'agent ont été mis en graphique. La concentration cytotoxique tuant 50 % des cellules par rapport au contrôle (CC_{50}) et la concentration où 50 % des cellules infectées par le virus et protégées (non détruites) par rapport au contrôle (CE_{50}) ont été déterminées à l'aide des équations des régressions linéaires.

4.3.12 Traitement statistique des données

Le test T de Student a été utilisé pour comparer deux points et déterminer s'ils étaient significativement différents à l'aide du logiciel Jump V.9. L'hypothèse nulle était que les moyennes des données des points étaient équivalentes.

4.4 Résultats et Discussion

4.4.1 Production des pigments algaux

H. provincialis et *H. karadagensis* ont été cultivées en erlenmeyer de façon à optimiser la quantité et la qualité des formes externe et interne des pigments produits. La croissance de ces espèces sous diverses intensités lumineuses est donnée au tableau 4.1. La culture d'*H. provincialis* initialement maintenue à $460 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ présentait des signes de surexposition lumineuse. En réduisant l'intensité lumineuse à $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la densité cellulaire a augmenté de 10 à 70×10^3 cellules mL^{-1} . De plus, les cellules semblaient plus mobiles et plus pigmentées. La quantité de débris cellulaires avait également diminué, ce qui est un autre signe de l'amélioration des conditions de croissance. Des observations similaires ont été faites pour *H. karadagensis* lorsque la densité lumineuse est ajustée de 180 à $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Les densités cellulaires avant et après la réduction de l'intensité lumineuse pour *H. provincialis* et *H. karadagensis* ont été comparées à l'aide du test-t de Student. Pour *H. provincialis* ($p = 0,006$) et *H. karadagensis* ($p = 0,0008$), la diminution de l'intensité lumineuse augmente significativement ($p = 0,006$) la densité cellulaire 5 jours après le repiquage. Ainsi, il a été trouvé que l'espèce *karadagensis* présente une croissance optimale à une intensité lumineuse plus faible que *H. provincialis*. La croissance de ces espèces est légèrement inférieure à ce qui est connu pour *H. ostrearia* qui présente une densité optique de 75×10^3 cellules mL^{-1} sous $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en 6 jours dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 250 mL de milieu de culture inoculé avec 5000 cellules mL^{-1} (Mouget *et al.*, 2005).

Tableau 4.1 Densité cellulaire des cultures d'*H. provincialis* et *H. karadagensis* sous différentes intensités lumineuses.

<i>H. provincialis</i>									
Date	Nb jour après repiquage	Intensité lumineuse $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Densité cellulaire $\times 10^3 \text{ mL}^{-1}$				moyenne	écart type	
			A	B	C	D			
10-10-15	0	460	-	-	-	-	-	-	
10-10-20	5	460	6,8	12,9	9,6	14,7	11,0	3,5	
10-10-27	7	460	-	-	-	-	-	-	
10-11-03	7	260	34,8	47,7	40,8	48,0	42,8	6,3	
10-11-08	5	260	21,2	26,2	30,9	25,0	25,8	4,0	
10-11-14	6	260	101,0	79,2	68,4	35,6	71,1	27,2	
<i>H. karadagensis</i>									
Date	Nb jour après repiquage	Intensité lumineuse $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Densité cellulaire $\times 10^3 \text{ mL}^{-1}$					moyenne	écart type
			A	B	C	D	E		
10-11-05	0	180	-	-	-	-	-	-	-
10-11-10	5	180	9,3	18,2	12,5	8,6	4,8	11,0	5,7
10-11-12*	7	180	17,4	26,7	54,2	48,8	15,2	36,2	18,4
10-11-14	2	140	7,3	30,8	26,0	20,7	27,8	26,3	4,2
10-11-25	11	140	63,5	49,4	48,7	68,5	127	73,5	37,1
10-11-30**	5	140	230	336	180	154	81,0	188	108
10-12-03	3	140	70,4	59,9	23,6	27,6	31,3	35,6	16,5

* Cultures diluées de moitié seulement.

** Le tapis cellulaire a décroché du fond des erlenmeyers.

La détermination de la densité cellulaire d'*H. karadagensis* a présenté une grande imprécision due à la morphologie de la culture. Cette souche a formé un biofilm au fond de l'erlenmeyer qui ne s'est pas toujours décroché complètement pour être mis en suspension suivant un même type d'agitation lors de la prise de l'échantillon. Ainsi, la densité cellulaire présente dans la colonne d'eau semble peu représentative de la quantité cellulaire totale dans l'erlenmeyer. Pour pallier à cette lacune de la méthode, les traitements auraient pu être effectués en triplicata et une valeur moyenne de la densité cellulaire aurait pu être déterminée pour chaque traitement. De plus, le protocole d'agitation aurait pu être modifié pour assurer le décrochage de la totalité du biofilm et une homogénéisation plus adéquate de l'échantillon. Par contre, une agitation trop vigoureuse pourrait entraîner la mort des cellules, ce qui

fausserait les mesures de croissance cellulaire. Ainsi, l'augmentation du nombre de répliques demeure l'option préférable.

La culture des diatomées bleues s'est effectuée aux intensités lumineuses plus faibles car c'est ainsi que la croissance des algues est la plus rapide, ce qui a permis la récupération d'une plus grande quantité de pigment de type marennine. Les conditions de culture choisies semblent favorables à l'obtention de cellules morphologiquement similaires à ce qui était attendu pour ces espèces. Les cellules d'*H. provincialis* étaient plus grandes (116 μm) et semblaient moins mobiles que *H. karadagensis* (50 μm). De plus, les cellules d'*H. karadagensis* présentaient une pigmentation plus grisâtre que bleue, ce qui correspond aux observations précédentes (Gastineau *et al.*, 2012a). Ceci confirme la santé de la culture et par le fait même, assure un pigment de qualité. En un mois, 20 g de biomasse et 30 L d'eau pigmentée ont été récupérés pour *H. provincialis*. Pour *H. karadagensis*, 5 g de biomasse et 5 L d'eau bleue ont été récupérés en 9 jours. Le rendement théorique de la récupération de la forme interne de la marennine d'*H. ostrearia* selon la méthode utilisée est de 2 mg/g de cellules culottées fraîches et de 3,2 mg/L d'eau bleue de la forme externe de marennine (Pouvreau *et al.*, 2006b). Ainsi, assez de biomasse et d'eau bleue ont été obtenues dans le cadre du stage pour procéder à la récupération des pigments d'*H. provincialis* mais pas pour *H. karadagensis*.

4.4.2 Extraction et purification des formes interne et externe des pigments de type marennine

La récupération des pigments a été effectuée sur la biomasse et l'eau bleue obtenues lors de la culture d'*H. provincialis*. La forme externe a été extraite à partir des 30 L d'eau bleue. Le pigment a été purifié et concentré en 50 mL suite à sa diafiltration et sa purification par chromatographie échangeuse d'anions. Ce volume correspond au volume attendu selon la méthode utilisée indiquant que la concentration de la forme externe du pigment a été efficace (Pouvreau *et al.*, 2006b).

La forme interne a été extraite à partir de 56 g de biomasse d'*H. provincialis*. La biomasse produite dans ce stage a été cumulée à des échantillons produits précédemment dans le laboratoire du Prof. Michèle Morançais (Université de Nantes, Nantes, France) selon une méthode de culture en bassin (Robert *et al.*, 2002). La forme interne du pigment a été

récupérée dans 4,2 L de tampon puis purifiée et concentrée dans 600 mL. Environ 2 fois plus de tampon ont été nécessaires pour extraire la forme interne produite par *H. provincialis* comparativement à ce qui a été obtenu pour *H. ostrearia* (Pouvreau *et al.*, 2006b). Aussi, le volume final de la solution concentrée de marennine purifiée par chromatographie d'échange d'anions était environ 20 fois supérieur à ce qui est obtenu pour *H. ostrearia* (Pouvreau *et al.*, 2006b). La concentration du pigment s'est donc effectuée moins efficacement. Ceci pourrait être expliqué par les différences structurales entre les pigments des espèces *provincialis* et *ostrearia* qui rendrait la récupération plus difficile dans le cas d'*H. provincialis* (Gastineau, 2011). Le rendement final n'a pas pu être déterminé, car les étapes de dialyse et de lyophilisation n'ont pu être réalisées dans le délai du stage et ont été complétées par Michèle Morançais. D'anciennes extractions de pigments ont été utilisées pour les tests biologiques effectués. La croissance d'*H. karadagensis* a été effectuée auparavant selon la méthode décrite à la section 4.3.2 tandis que la croissance d'*H. ostrearia* a été effectuée dans des cultures en bassin (Robert *et al.*, 2002).

4.4.3 Effets biologiques de la marennine

4.4.3.1 Effets cytotoxiques et antiviraux

L'Herpes simplex (HSV) est un virus important chez l'humain qui cause plusieurs maladies dont certaines peuvent être mortelles. L'émergence de souches HSV résistantes aux médicaments antiviraux habituellement utilisés contre ce virus pousse la recherche vers le développement de nouveaux médicaments antiviraux efficaces et peu cytotoxiques (Abreu *et al.*, 2011). Les propriétés antivirales de la marennine extraite d'*H. ostrearia* ont déjà été démontrées (Bergé *et al.*, 1999). Ainsi, il est intéressant de les comparer au pigment d'*H. karadagensis* pour identifier de nouveaux composés antiviraux efficaces. La forme externe des pigments d'*H. ostrearia* et d'*H. karadagensis* a été testée sur les cellules Vero afin de détecter un effet cytotoxique ou un effet antiviral. Les cellules ont été exposées aux pigments à différentes concentrations (1, 10 et 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La figure 4.3 illustre l'augmentation du pourcentage de destruction cellulaire qui est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de pigment pour *H. ostrearia* et inversement proportionnelle pour *H. karadagensis*. Ces relations sont relativement linéaires pour les pigments des deux espèces

d'algues. L'augmentation de la concentration du pigment semble causer un accroissement de l'effet de protection des cellules Vero contre le virus HSV-1.

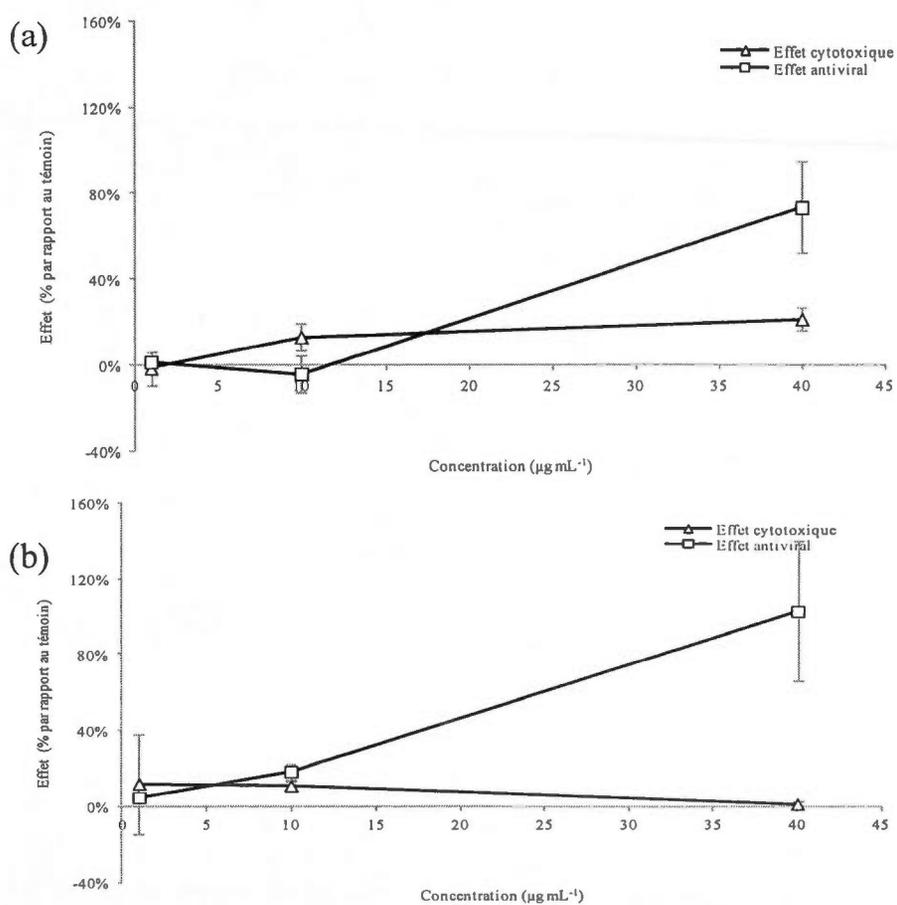


Figure 4.3 Effet destructeur de cellules (cytotoxique) et effet protecteur contre le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) (antiviral) de la forme externe des pigments de (a) *H. ostrearia* et (b) d'*H. karadagensis* à différentes concentrations.

En exprimant les effets destructeurs et protecteurs en fonction du logarithme en base 10 des concentrations testées, la linéarité des séries de données a été augmentée. Les résultats sont illustrés à la figure 4.4 et les informations reliées aux régressions linéaires sont données au tableau 4.2. Les régressions linéaires présentent un coefficient de détermination (R^2) qui est loin de la valeur cible de 1 dans la plupart des cas, indiquant que les données sont peu corrélées, ce qui limite la validité du modèle linéaire pour exprimer la tendance des séries de données. Quatre répliquats de l'exposition aux cellules aux pigments marennine ont été faites et l'écart-type a été illustré sur la figure 4.3 et la figure 4.4. L'écart-type varie beaucoup d'un point à un autre et peut être assez grand, indiquant la faible reproductibilité de la méthode.

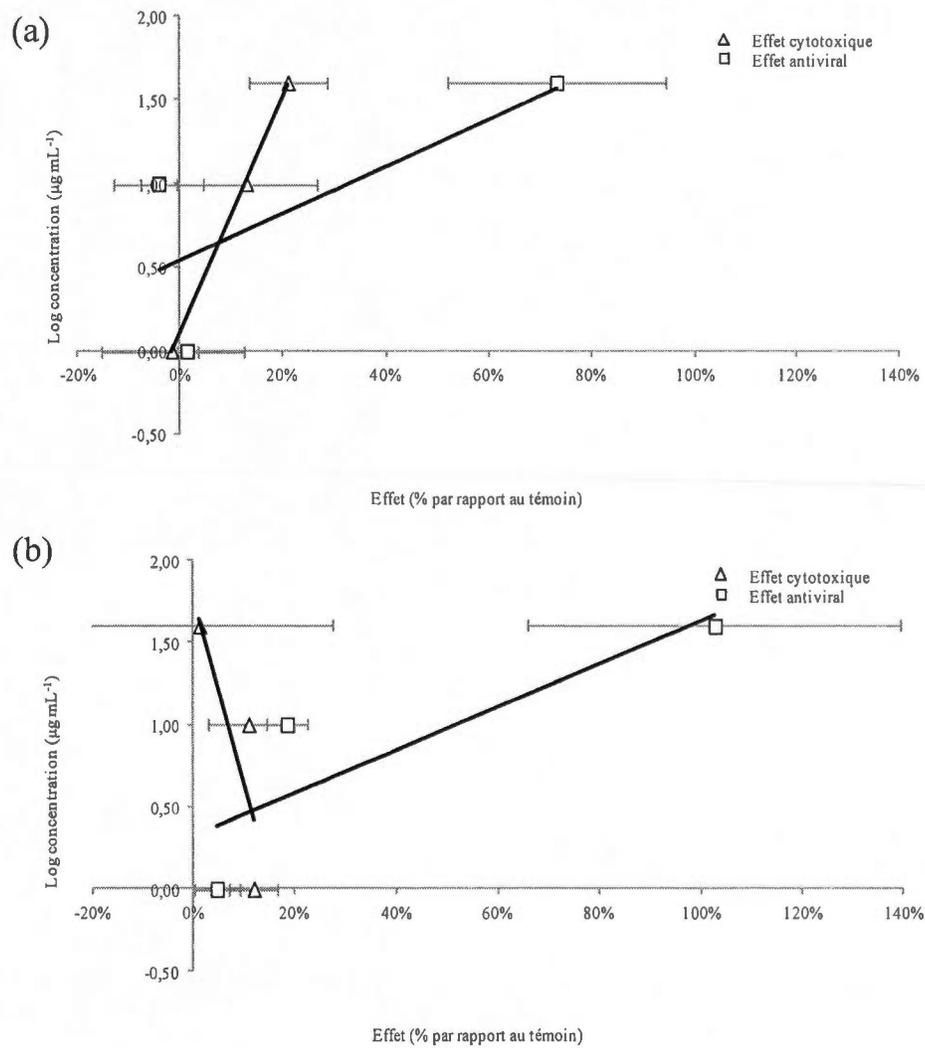


Figure 4.4 Effet de protection contre le virus HSV-1 (effet antiviral) des cellules Vero et de destruction (effet cytotoxique) en présence de différentes concentrations de pigments de (a) *H. ostrearia* et (b) *H. karadagensis* exprimées sous forme logarithmique.

Tableau 4.2 CX_{50} calculée à partir des régressions linéaires des effets antiviraux et cytotoxiques de la forme externe des pigments d'*H. ostrearia* et d'*H. karadagensis* et du médicament Zovirax à différentes concentrations exprimées sous forme logarithmique.

Agent	<i>H. ostrearia</i> ext.		<i>H. karadagensis</i> ext.		Zovirax	
	Cytotoxique CC_{50}	Antiviral CE_{50}	Cytotoxique CC_{50}	Antiviral CE_{50}	Cytotoxique CC_{50}	Antiviral CE_{50}
Pente	7,03	1,39	-11,45	1,31	-3,26	1,40
Ordonnée Origine	0,10	0,54	1,80	0,32	-0,75	-1,10
R^2	1,00	0,55	0,70	0,74	0,4	0,80
CX_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4152	17	0	9	0	0,40

Un agent antiviral d'effet connu a été testé pour évaluer la justesse de la méthode. Le Zovirax (acyclovir) est le médicament actuellement prescrit contre le virus HSV-1, car il est peu toxique et a une grande activité antivirale. Les résultats obtenus avec le Zovirax sont illustrés à la figure 4.5 et les informations reliées à la régression linéaire sont inclus au tableau 4.2. À très faible concentration ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), le Zovirax atteint un pourcentage de protection cellulaire de 90 % qui plafonne à plus grandes concentrations. La CE_{50} obtenue est de $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ce qui est semblable aux valeurs précédemment obtenues pour un système similaire (Abreu *et al.*, 2011). Aucun effet cytotoxique n'a été observé puisque le pourcentage de destruction cellulaire est demeuré autour de 0 % (figure 4.5) avec une faible décroissance vers les pourcentages négatifs aux concentrations testées. Ceci entraîne une pente fortement négative au lieu de positive et la valeur de CC_{50} calculée est près de 0 au lieu d'être près de l'infini tel qu'attendu pour un agent non cytotoxique. La même conclusion est tirée de la valeur de 0% de la CE_{50} du pigment d'*H. karadagensis*. Des travaux antérieurs sur les cellules Vero exposées de façon similaire au Zovirax ont trouvé la valeur de 194 comme CC_{50} ce qui équivaut à $194 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Abreu *et al.*, 2011).

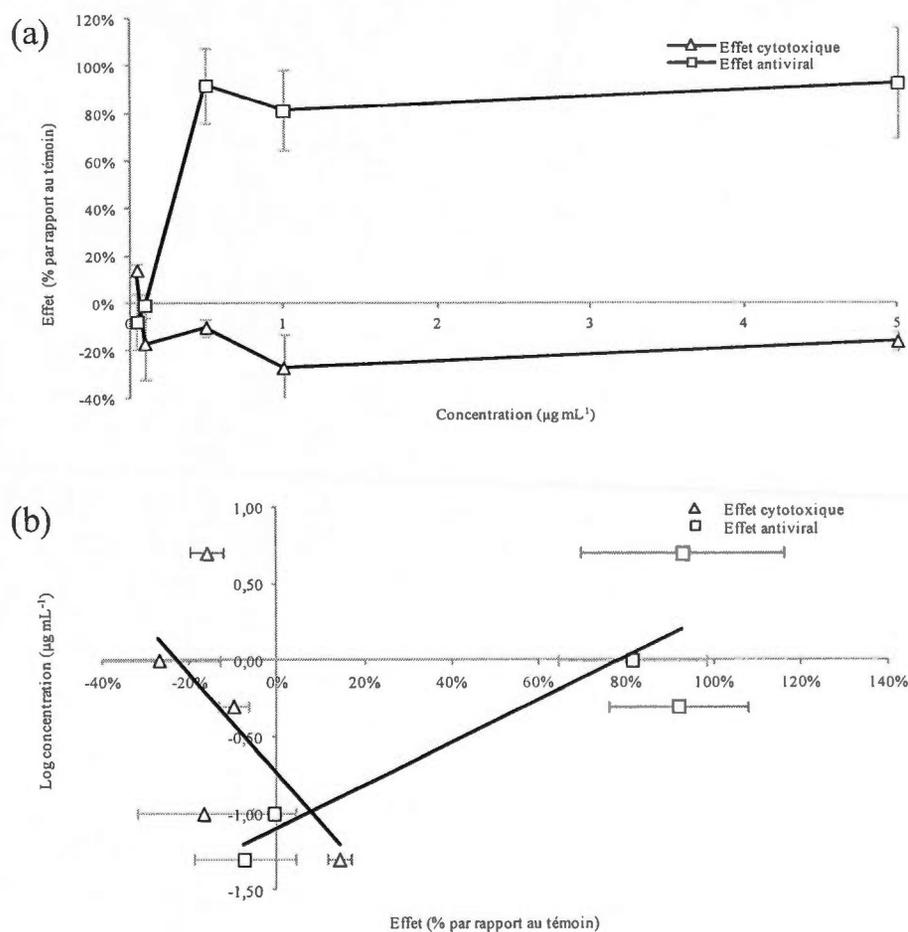


Figure 4.5 Effet cytotoxique (pourcentage de destruction) et effet antiviral (pourcentage de protection contre le virus HSV-1 des cellules Vero en présence de différentes concentrations du médicament Zovirax (a) et (b) exprimées de façon logarithmique.

Les effets cytotoxiques et antiviraux déterminés pour le Zovirax correspondent à ce qui était attendu, ce qui confirme la justesse de la méthode. Par contre, la faible reproductibilité de la méthode déduite des grandes valeurs d'écart type a limité la précision des valeurs obtenues avec ce test biologique.

Outre les lacunes du test biologique utilisé, les pigments semblent présenter une activité antivirale significative puisqu'ils protègent les cellules Vero du virus de l'Herpes à de faibles concentrations. En effet, la CE_{50} des pigments est faible bien que 40 et 20 fois supérieure à celle du médicament Zovirax (le pigment d'*H. karadagensis* semble être plus

efficace) tel qu'illustré au tableau 4.2. De plus, les pigments présentent une cytotoxicité très faible pour les deux espèces d'algues. Encore une fois, le pigment d'*H. karadagensis* semble être moins cytotoxique que la marennine.

Pour résumer, le pigment d'*H. karadagensis* semble moins cytotoxique et plus actif contre le virus HSV-1 que la marennine. Ceci rend la structure chimique du pigment d'*H. karadagensis* un candidat plus prometteur pour le développement de futurs médicaments antiherpétiques. De plus, ces résultats suggèrent la recherche de nouvelles souches d'*Haslea* pour découvrir de nouvelles espèces ayant possiblement des pigments avec des propriétés biologiques surpassant celles d'*H. karadagensis*. Il serait intéressant de développer des médicaments antiviraux ayant des CE_{50} plus faibles que celles des pigments de type marennine puisque ça conduirait à des traitements utilisant des concentrations moins élevées en composés actifs, ce qui minimise les effets secondaires possibles. Les pigments extraits de diatomées bleues présentent des activités biologiques qui pourraient conduire au développement de nouveaux agents antiviraux alternatifs aux médicaments comme le Zovirax, ce qui permettrait de soigner les patients infectés par les souches résistantes au Zovirax du virus HSV-1 (Abreu *et al.*, 2011).

4.5 Conclusion

Le stage en France a permis d'identifier un nouvel agent antimicrobien ayant un effet sur les membranes d'*E. coli*. Les conditions de croissance d'*H. provincialis* et d'*H. karadagensis* ont été améliorées pour atteindre des densités cellulaires élevées tout en préservant une morphologie typique d'une culture en santé, ce qui a assuré la quantité et la qualité des pigments produits. Les cultures de chacune de ces espèces d'*Haslea* ont permis d'accumuler une quantité significative de biomasse et d'eau pigmentée pour *H. provincialis*, mais pas suffisante dans le cas d'*H. karadagensis* pour permettre la récupération des pigments. La forme interne du pigment d'*H. provincialis* n'a pas été concentrée de façon aussi efficace qu'attendu, mais la récupération et la purification des deux formes ont été possibles. Il aurait été pertinent de vérifier la pureté des pigments purifiés par spectroscopie UV-VIS et par électrophorèse sur gel pour s'assurer de la similitude des bandes d'absorption et de la masse moléculaire et confirmer l'absence d'impuretés. Ainsi, les tests biologiques effectués ultérieurement auraient été faits assurément avec des pigments purs. Les formes

externes des pigments d'*H. karadagensis* et d'*H. ostrearia* ont présenté une activité antivirale contre le virus HSV-1 ainsi qu'une faible cytotoxicité, ce qui fait de ce pigment algal un excellent candidat pour le développement de nouveaux médicaments antiherpétiques, surtout la forme externe du pigment d'*H. karadagensis* serait plus efficace et moins toxique que la marennine d'*H. ostrearia*. Ce travail de recherche souligne les effets antiviraux et antibactériens des pigments de type marennine, illustrant ainsi le potentiel que représentent les pigments extraits de diatomées bleues pour le développement de nouveaux médicaments.

CONCLUSION

Le but du projet était de développer une technique d'analyse des interactions entre les antibiotiques et les membranes qui seraient plus représentative que l'utilisation de modèles composés de lipides artificiels et plus accessible que l'utilisation de souches mutantes. Ce projet portait donc sur le développement d'une technique d'analyse des membranes cellulaires des bactéries entières non-mutées analysées *in vivo* par ^2H RMN-ÉS en présence d'agents antimicrobiens. Le projet avait également pour objectif l'évaluation de la sensibilité de la méthode développée en analysant trois agents antimicrobiens d'effets connus et complémentaires. Le dernier but du projet était l'évaluation du potentiel des pigments de type marennine comme cible pour le développement de nouveaux antibiotiques perturbateurs de membrane à l'aide de la technique de ^2H RMN-ÉS *in vivo* développée. La réalisation de ces objectifs mettrait donc en valeur une méthode qui permet de catalyser le développement de nouveaux antibiotiques agissant sur les membranes, ce qui pourrait éventuellement mieux outiller les patients contre les bactéries multirésistantes.

La difficulté de la ^2H RMN-ÉS *in vivo* est la nécessité de marquer spécifiquement les membranes des cellules au ^2H et de les garder en vie tout au long de l'analyse. De plus, le marquage ne doit pas perturber les interactions entre les agents antimicrobiens et les membranes. Diverses méthodes existent pour marquer spécifiquement les membranes au ^2H et la méthode qui a été choisie dans ce projet était une nouvelle approche plus accessible puisque la deutération a pu être faite sur *E. coli* sauvage, donc aucune mutation spécifique n'a été requise. En faisant croître les bactéries dans un milieu de culture contenant de l'acide palmitique deutéré micellisé à l'aide de dodécylphosphocholine, les acides gras exogènes ont été incorporés dans les phospholipides par la machinerie cellulaire ce qui deutère spécifiquement les membranes. C'est assurément une des techniques qui permet les études les plus représentatives puisque la membrane marquée est relativement conforme aux

membranes naturelles d'*E. coli* (une partie des chaînes lipidiques des phospholipides sont deutérées au lieu d'être hydrogénées).

Il serait intéressant de remplacer le détergent dodecylphosphocholine puisque ce dernier requiert des cycles de congélation et fonte du milieu pour micelliser l'acide palmitique exogène. Ces étapes sont longues et compliquent la méthode développée. En remplaçant le dodécylphosphocholine par le détergent Brij-58, la micellisation se ferait lors de l'autoclave du milieu de culture ce qui simplifierait la méthode et la rendrait encore plus accessible (Davis *et al.*, 1979 ; Pius, Morrow et Booth, 2012).

La détermination du profil lipidique des acides gras des bactéries marquées confirme la représentativité de la technique de marquage puisque le profil lipidique des bactéries marquées est similaire à celui de bactéries non marquées à l'exception de l'augmentation du rapport d'acides gras saturés / insaturé. Le pourcentage de deutération (m PA-d₃₁/m AG total) des membranes est de 76 % ce qui a permis un rapport signal sur bruit adéquat lors de l'analyse ²H RMN-ÉS ce qui souligne le fait que l'utilisation de mutants n'est pas nécessaire.

Pour augmenter la représentativité des mécanismes étudiés, l'échantillon doit être maintenu vivant le plus longtemps possible lors de son analyse. Pour déterminer le taux de survie lors de l'analyse par ²H RMN-ÉS, la viabilité cellulaire à l'entrée et à la sortie du rotor après l'analyse ont été comparées selon la méthode de réduction du MTT. Le protocole de rinçage a également été vérifié afin qu'il minimise la destruction des cellules en comparant la viabilité cellulaire des cellules en culture comparées aux cellules avant leur analyse. Un autre indice de la qualité de l'échantillon est la forme de son spectre. Les échantillons ayant un faible paramètre X étaient considérés de meilleure qualité et moins dégradés. C'est ainsi qu'il a été déterminé qu'un maximum de 2 heures doit s'écouler entre le moment où les cellules sont récoltées et le début de leur analyse ²H RMN-ÉS selon les conditions de rinçage optimisées. 78 % de la viabilité cellulaire a été maintenue lors de la préparation de l'échantillon et ceci diminue à 42 % à la fin de l'analyse par ²H RMN-ÉS. Ceci qualifie donc la technique développée comme étant *in vivo* puisque la majorité des cellules survivent à l'analyse par ²H RMN-ÉS. Par contre, ce taux de survie pourrait possiblement être augmenté davantage en utilisant des solutions de rinçage et d'analyse tamponnées. Aussi, l'expérience de ²H RMN-ÉS pourrait être faite à l'aide d'un système spécialisé pour analyse *in vivo* qui

permettrait le flux continu d'éléments nutritifs lors de l'analyse (Grivet et Delort, 2009). Par contre, l'utilisation de sondes spécifiques limiterait l'accessibilité de la méthode développée.

Le modèle bactérien développé a été mis à l'épreuve en étudiant son comportement thermotropique et en le comparant à ce qui est connu pour des extraits de membranes deutérées d'*E. coli*. Le modèle comporte beaucoup de similitudes avec la membrane externe et internes intactes de Davis *et al.*, 1979 ce qui confirme le succès du marquage spécifique aux membranes. L'efficacité du modèle à décrire les mécanismes d'action des antibiotiques naturels du genre lipopeptide cationique qui sont des molécules promotrices pour le développement de nouveaux antibiotiques a été testé à l'aide de la PxB. L'incorporation de la chaîne lipidique de la PxB dans la membrane interne est confirmée par la présence de phases plus rigides dans le spectre, ce qui est en accord avec le mécanisme attendu pour une concentration de 1 % m/m de bactéries sèches. Le fullerénol semble interagir plus avec les LPS de la membrane externe en influençant moins la membrane interne, ce qui est suggéré par une rigidification du spectre qui fut facilement détectée. Ce résultat souligne l'importance de comparer les analyse ^2H RMN-ÉS fait sur des cellules intactes avec des études faites sur des membranes modèles. Le mécanisme d'action du détergent cationique CTAC a été suggéré par l'intense rigidification des membranes fort probablement causée par l'insertion des chaînes lipophiles du détergent dans les membranes cellulaires, ce qui diminue la mobilité des chaînes lipidiques des phospholipides et crée des phases gel au détriment d'une phase liquide cristalline assurant la survie de la cellule. Finalement, la justesse et la sensibilité de la méthode sont donc confirmées par l'étude des trois agents antimicrobiens puisque les observations effectuées concordent avec les mécanismes connus.

La marennine est un pigment bleu retrouvé chez certaines diatomées *Haslea* comme *H. ostrearia*. La structure exacte de la molécule est inconnue, mais elle semble être similaire aux polyphénols. Tout comme les polyphénols, la marennine présente une activité biologique intéressante (Pouvreau *et al.*, 2006a). Le stage en France a permis d'optimiser la croissance d'*H. provincialis* et d'*H. karadagensis* en réduisant l'intensité lumineuse, ce qui a assuré des cultures qui semblaient visuellement en santé produisant donc un pigment marennine de qualité en grande quantité. L'extraction des formes interne et externe des pigments d'*H. provincialis* a pu être complétée avec succès malgré la concentration moins efficace de la

forme interne. Les formes externes d'*H. ostrearia* et d'*H. karadagensis* ont été testées sur les cellules Vero pour déterminer leur cytotoxicité et leur effet antiviral sur le virus HSV-1. Le pigment d'*H. karadagensis* était moins toxique et plus efficace pour protéger les cellules Vero contre le virus ce qui oriente les recherches sur de nouveaux agents antiviraux sur l'espèce *H. karadagensis*.

Les propriétés antimicrobiennes de la marennine et sa parenté aux composés polyphénoliques ont guidé le projet vers la détermination du mécanisme d'action de la marennine sur les membranes d'*E. coli*. Ainsi, les formes interne et externe du pigment marennine ont pu être récupérées suite à l'optimisation de la croissance des algues. L'analyse par ^2H RMN-ÉS indique que la forme externe de la marennine a un effet similaire aux nanoparticules de fullerénol sur les membranes d'*E. coli*. Ces interactions entre l'agent actif et les membranes bactériennes sont possiblement la cause de l'action antibiotique de ce pigment. Plus intéressante encore est que la forme interne de la marennine affecte différemment les membranes d'*E. coli*. Une petite augmentation de la fluidité semble se produire. Ainsi, les différences d'effets antimicrobiens semblent correspondre aux différences d'interaction entre les pigments et la membrane d'*E. coli* confirmant l'hypothèse que la perturbation des membranes est une étape clé dans le mécanisme antimicrobien.

De plus, il a été démontré que les formes externes de la marennine et du pigment d'*H. karadagensis* sont peu toxique, ce qui rend ces molécules une cible de choix pour le développement de nouveaux antibiotiques. Pour mieux comprendre les différences entre les formes interne et externe, les structures de ces dernières pourraient être élucidées, mais cette tâche est laborieuse puisque la récupération de la biomasse est fastidieuse et que la marennine est une molécule de grande taille (10 kDa) ce qui implique un travail de longue haleine pour déterminer sa structure par RMN.

Pour conclure, ce projet a donc permis la mise au point une technique simple et accessible pour étudier de façon représentative les interactions entre les agents antimicrobiens et les membranes de la bactérie *E. coli* analysée *in vivo*. De plus, la technique s'avère être assez sensible pour différencier les interactions de 3 agents antimicrobiens d'action connue et complémentaire. Ainsi, la forme externe de pigments de type marennine a pu être identifiée

comme étant possiblement un agent antimicrobien à action membranaire pertinent dans le développement de nouveaux antibiotiques.

Beaucoup d'efforts pourraient être mis encore pour mieux caractériser le modèle développé. Il serait pertinent d'évaluer si d'autres constituants cellulaires que les phospholipides sont deutérés puisque le cycle de β -oxydation des acides gras n'est pas bloqué en utilisant une souche sauvage. Ainsi, la deutération spécifique des membranes serait assurée. Aussi, il serait pertinent de caractériser quels types de phospholipides sont deutérés pour confirmer une réponse représentative de la membrane et non d'un seul de ses constituants. Ainsi, la proportion d'acide palmitique deutéré inséré aux positions 1 et/ou 2 du phosphoglycérol pourrait être déterminée. Il en va de même pour les types de phospholipides deutérés. Finalement, il serait intéressant de déterminer le profil lipidique pour la membrane externe et interne seulement pour déterminer où se situe la majeure partie des lipides deutérés.

Il serait intéressant de créer de nouveaux outils complémentaires à celui développé dans ce projet pour étudier les interactions entre les agents antimicrobiens et les membranes dans le but de répondre à la problématique causée par le phénomène de résistance des pathogènes. Les travaux à venir pourraient porter sur le développement d'une bactérie *E. coli* marquée spécifiquement à la tête des phospholipides pour mieux saisir les interactions des agents antimicrobiens agissant en surface de la bicouche lipidique comme la marennine semble faire. Aussi, il serait intéressant de développer un autre modèle à base d'une bactérie Gram positif pour élucider les mécanismes d'action de certains antibiotiques spécifiques à ce type de bactérie. De plus, développer d'autres modèles qu'*E. coli* pour l'étude des interactions entre la marennine et les membranes analysées *in vivo* permettrait de mieux comprendre les effets allélotropiques. La bactérie marine du genre *Vibrio* serait une bonne candidate puisque ces bactéries marines se retrouvent dans les claires où l'affinage des huîtres se réalise. Aussi, d'autres micro-organismes comme les microalgues compétitrices pourraient être marquées afin de déterminer si l'effet allélotropique de la marennine est causé par la perturbation des membranes de ces microalgues à l'image de ce que l'on a observé pour la bactérie *E. coli*. Cette étude ouvre donc la porte à la création de nouveaux modèles

simples et représentatifs qui pourrait permettre la compréhension des mécanismes d'action de divers antibiotiques naturels et synthétiques moins susceptibles au phénomène de résistance.

RÉFÉRENCES

- Abreu, P. A., V. A. G. G. da Silva, F. C. Santos, H. C. Castro, C. S. Riscado, M. T. de Souza, C. P. Ribeiro, J. E. Barbosa, C. C. C. dos Santos, C. R. Rodrigues, V. Lione, B. A. M. Correa, A. C. Cunha, V. F. Ferreira, M. C. B. V. de Souza et I. C. N. P. Paixao. 2011. «Oxoquinoline Derivatives: Identification and Structure–Activity Relationship (SAR) Analysis of New Anti-HSV-1 Agents». *Current Microbiology*, vol. 62, p. 1349-1354.
- Ahlström, B., M. Chelminska-Bertilsson, R.A. Thompson et L. Edebo. 1997. «Submicellar Complexes May Initiate the Fungicidal Effects of Cationic Amphiphilic Compounds on *Candida albicans*». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, p. 544-550.
- Allison, A.C., Young, M.R. 1964. «Uptake of Dyes and Drugs by Living Cells in Culture». *Life Science*, vol. 3, p. 1407-1414.
- Almgren, M. 2000. «Mixed Micelles and Other Structures in the Solubilization of Bilayer Lipid Membranes by Surfactants». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1508, p. 146-163.
- Anonyme. 2010. «Functional Anatomy of Prokaryotic Cells». En ligne. <http://www2.raritanval.edu/departments/Science/full-time/Weber/Microbiology%20Majors/SoftChalkeCoursesubmission/chapter4sub/chapter4sub_print.html>. Consulté le 7 janvier.
- Aoshima, H., K.E.N. Kokubo, S. Shirakawa, M. Ito, S. Yamana et T. Oshima. 2009. «Antimicrobial Activity of Fullerenes and Their Hydroxylated Derivatives». *Biocontrol Science*, vol. 14, p. 69-72.
- Arouri, A., M. Dathe et A. Blume. 2009. «Peptide Induced Demixing in PG/PE Lipid Mixtures: A Mechanism for the Specificity of Antimicrobial Peptides Towards Bacterial Membranes?». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1788, p. 650–659.

- Balla, M. S., J. H. Bowie et F. Separovic. 2004. «Solid-state NMR Study of Antimicrobial Peptides from Australian Frogs in Phospholipid Membranes». *European Biophysics Journal*, vol. 33, p. 109-116.
- Barrett, C. T., et J. F. Barrett. 2003. «Antibacterials: Are the New Entries Enough to Deal with the Emerging Resistance Problems?». *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, p. 621-626.
- Beek, J. D. van. 2007. «matNMR: A Flexible Toolbox for Processing, Analyzing and Visualizing Magnetic Resonance data in Matlab®». *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 187, p. 19-26.
- Bélanger, L., A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau et C. M. Dozois. 2011. «*Escherichia coli* from Animal Reservoirs as a Potential Source of Human Extraintestinal Pathogenic *E. coli*». *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 62, p. 1-10.
- Bell, R. M. 1974. «Mutants of *Escherichia coli* Defective in Membrane Phospholipid Synthesis: Macromolecular Synthesis in an sn-Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase Km Mutant». *Journal of Bacteriology*, vol. 117, p. 1065-1076.
- Bergé, J. P., N. Bourgougnon, S. Alban, F. Pojer, S. Billaudel, J. C. Chermann, J. M. Robert et G. Franz. 1999. «Antiviral and Anticoagulant Activities of a Water-soluble Fraction of the Marine Diatom *Haslea ostrearia*». *Planta Medica*, vol. 65, p. 604-609.
- Beyer, K. 1986. «A ^{31}P and ^2H -NMR Study on the Structural Perturbations Induced by Charged Detergents in the Headgroup Region of Phosphatidylcholine Bilayers». *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 855, p. 365-374.
- Blume, A. 1993. «Dynamic Properties». In *Phospholipids Handbook*, Grejor Cevc, p. 455-509. New York: Marcel Dekker Inc.
- Brinster, S., G. Lamberet, B. Staels, P. Trieu-Cuot, A. Gruss et C. Poyart. 2009. «Type II Fatty Acid Synthesis is not a Suitable Antibiotic Target for Gram-Positive Pathogens». *Nature*, vol. 458, p. 83-86.
- Brisebois, P. P., A. A. Arnold, R. Roy et I. Marcotte. 2012. «Comparative Study of the Interaction of Fullerenol Nanoparticles with Eukaryotic and Bacterial Model Membranes Using Solid-State NMR and FTIR Spectroscopy». *European Biophysics Journal*, vol. sous presse.

- Bush, Karen, et Michael J. Pucci. 2011. «New Antimicrobial Agents on the Horizon». *Biochemical Pharmacology*, vol. 82, p. 1528-1539.
- Byers, D. M. 1989. «Elongation of Exogenous Fatty Acids by the Bioluminescent Bacterium *Vibrio harveyi*». *Journal of Bacteriology*, vol. 171, p. 59-64.
- Byers, D. M., et Z. Shen. 2002. «Biochemical Evidence Against Protein-Mediated Uptake of Myristic Acid in the Bioluminescent Marine Bacterium *Vibrio harveyi*». *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 48, p. 933-939.
- Cantón, R., et M.-I. Morosini. 2011. «Emergence and Spread of Antibiotic Resistance Following Exposure to Antibiotics». *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 35, p. 977-991.
- Carbonnelle, D., P. Pondaven, M. Morancais, G. Masse, S. Bosch, C. Jacquot, G. Briand, J. M. Robert et C. Roussakis. 1999. «Antitumor and Antiproliferative Effects of an Aqueous Extract from the Marine Diatom *Haslea ostrearia* (Simonsen) Against Solid Tumors: Lung Carcinoma (NSCLC-N6), Kidney Carcinoma (E39) and Melanoma (M96) Cell Lines». *Anticancer Research*, vol. 19, p. 621-624.
- Cheng, X., Q. M. Tran, P. J. Foht, R. N. A. H. Lewis et R. N. McElhaney. 2002. «The Biosynthetic Incorporation of Short-Chain Linear Saturated Fatty Acids by *Acholeplasma laidlawii* B May Suppress Cell Growth by Perturbing Membrane Lipid Polar Headgroup Distribution». *Biochemistry*, vol. 41, p. 8665-8671.
- Clausell, A., M. Pujol, M.A. Alsina et Y. Cajal. 2003. «Influence of Polymyxins on the Structural Dynamics of *Escherichia coli* Lipid Membranes». *Talanta*, vol. 60, p. 225-234.
- Davies, J., et D. Davies. 2010. «Origins and Evolution of Antibiotic Resistance». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, p. 417-433.
- Davis, J. H. 1979. «Deuterium Magnetic Resonance Study of the Gel and Liquid Crystalline Phases of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine». *Biophysical Journal*, vol. 27, p. 339-358.
- Davis, J. H. 1983. «The Description of Membrane Lipid Conformation, Order and Dynamics by $^2\text{H-NMR}$ ». *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 737, p. 117-171.
- Davis, J. H., J. J. Clair et J. Juhasz. 2009. «Phase Equilibria in DOPC/DPPC- d_{62} /Cholesterol Mixtures». *Biophysical Journal*, vol. 96, p. 521-539.

- Davis, J. H., K. R. Jeffrey, M. Bloom, M. I. Valic et T. P. Higgs. 1976. «Quadrupolar Echo Deuteron Magnetic Resonance Spectroscopy in Ordered Hydrocarbon Chains». *Chemical Physical Letters*, vol. 42, p. 390-394.
- Davis, J. H., C. P. Nichol, G. Weeks et M. Bloom. 1979. «Study of the Cytoplasmic and Outer Membranes of *Escherichia coli* by Deuterium Magnetic Resonance». *Biochemistry*, vol. 18, p. 2103-2112.
- Delcour, A. H. 2009. «Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1724, p. 808-819.
- Dowhan, W., et M. Bogdanov. 2002. «Functional Roles of Lipids in Membranes». In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4ième édition, D.E. Vance et J.E. Vance, p. 1-37. Amsterdam: Elsevier Science.
- Eeman, M., et M. Deleu. 2010. «From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes». *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, vol. 14, p. 719-736.
- Epanand, R. M., et R. F. Epanand. 2011. «Bacterial Membrane Lipids in the Action of Antimicrobial Agents». *Journal of Peptide Science*, vol. 17, p. 298-305.
- Esfahani, M., E. M. Barnes et S. J. Wakil. 1969. «Control of Fatty Acid Composition in Phospholipids of *Escherichia coli* : Response to Fatty Acid Supplements in a Fatty Acid Auxotroph». *Biochemistry*, vol. 64, p. 1057-1064.
- Esfahani, M., T. Itoneda et S. J. Wakil. 1971. «Studies on the Control of Fatty Acid Metabolism III. Incorporation of Fatty Acids Into Phospholipids and Regulation of Fatty Acid Synthetase of *Escherichia Coli*». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 246, p. 50-56.
- FAO. 2009. «La Situation Mondiale des Pêches et de l'Aquaculture 2008». *Fisheries technical paper*, vol. 500, p. 194.
- Finter, N. B. 1969. «Dye Uptake Methods for Assessing Viral Cytopathogenicity and their Application to Interferon Assays». *Journal of General Virology*, vol. 5, p. 419-427.
- Garnier-Lhomme, M., A. Grélard, R. D. Byrne, C. Loudet, E. J. Dufourc et B. Larijani. 2007. «Probing the Dynamics of Intact Cells and Nuclear Envelope Precursor Membrane Vesicles by Deuterium Solid State NMR Spectroscopy». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1768, p. 2516-2527.

- Gastineau, R. 2011. «Biodiversité, Reproduction et Phylogénie des Diatomées Bleues du Genre *Haslea* et Valorisation de leurs Pigments de Type Marennine». Le Mans, Biology, Université du Maine, p. 328
- Gastineau, R., N. A. Davidovich, J.-F. Bardeau, A. Caruso, V. Leignel, Y. Hardivillier, B. Jacquette, O. Davidovich, Y. Rincé, P. Gaudin, E. Cox et J.-L. Mouget. 2012a. «*Haslea karadagensis* sp. nov. (Bacillariophyta), a New Diatom from the Black Sea Producing a Blue Pigment Different from Marennine». *European Journal of Phycology*, vol. sous presse.
- Gastineau, R., J.-B. Pouvreau, C. Hellio, M. Morançais, J. Fleurence, P. Gaudin, N. Bourgougnon et J.-L. Mouget. 2012b. «Biological Activities of Purified Marennine, the Blue Pigment Responsible for the Greening of Oysters». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, p. 3599-3605.
- Gehman, J. D., F. Luc, K. Hall, T.-H. Lee, M. P. Boland, T. L. Pukala, J. H. Bowie, M.-I. Aguilar et F. Separovic. 2008. «Effect of Antimicrobial Peptides from Australian Tree Frogs on Anionic Phospholipid Membranes». *Biochemistry*, vol. 47, p. 8557-8565.
- Gelderman, M. P, O. Simakova, J. D Clogston, A. K Patri, S. F Siddiqui, A. C. Vostal et J. Simak. 2008. «Adverse Effects of Fullerenes on Endothelial Cells: Fullereneol C₆₀(OH)₂₄ Induced Tissue Factor and ICAM-1 Membrane Expression and Apoptosis *in vitro*». *International Journal of Nanomedicine*, vol. 3, p. 59-68.
- Glover, R.E., R.R. Smith, M.V. Jones, S.K. Jackson et C.C. Rowlands. 1999. «An EPR Investigation of Surfactant Action on Bacterial Membranes». *FEMS Microbiology Letters*, vol. 177, p. 57-62.
- Goldfine, H., et K. Bloch. 1961. «On the Origin of Unsaturated Fatty Acids in *Clostridia*». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 236, p. 2596-2601.
- Grivet, J.-P., et A.-M. Delort. 2009. «NMR for Microbiology: *In vivo* and *in situ* Applications». *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 54, p. 1-53.
- Hahn, E. L. 1950. «Spin Echoes». *Physical Review*, vol. 80, p. 580-594.
- Hallaq, H., A. Sellemayer, T. W. Smith et A. Leaf. 1990. «Protective Effect of Eicosapentaenoic Acid on Ouabain Toxicity in Neonatal Rat Cardiac Myocytes». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, p. 7834-7838

- Heath, R. J., S. Jackowski et C. O. Rock. 2002. «Fatty Acid and Phospholipid Metabolism in Prokaryotes». In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4ième édition, D.E. Vance et J.E. Vance, p. 55-92. Amsterdam: Elsevier Science.
- Iliades, P., S. R. Meshnick et I. G. Macreadie. 2005. «Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS Gene Confer Cross-Resistance to Sulfa Drugs». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, p. 741-748.
- Ivancic, T., M. Vodovnik, R. Marinsek-Logar et D. Stopar. 2009. «Conditioning of the Membrane Fatty Acid Profile of *Escherichia coli* During Periodic Temperature Cycling». *Microbiology*, vol. 155, p. 3461-3463.
- Jarrell, H. C., K. W. Butler, R. A. Byrd, R. Deslauriers, I. Ekiel et !. C. P. Smith. 1982. «A ^2H -NMR Study of *Acholeplasma laidlawii* Membranes Highly Enriched in Myristic Acid». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 688, p. 622-636.
- Jenssen, H., P. Hamill et R. E. W. Hancock. 2006. «Peptide Antimicrobial Agents». *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, p. 491-511.
- Jiang, Y., R. M. Morgan-Kiss, J. W. Campbell, C. H. Chan et J. E. Cronan. 2010. «Expression of *Vibrio harveyi* Acyl-ACP Synthetase Allows Efficient Entry of Exogenous Fatty Acids into the *Escherichia coli* Fatty Acid and Lipid A Synthetic Pathways». *Biochemistry*, vol. 49, p. 718-726.
- Johnston, N. C., H. Goldfine, M. Malthaner et J. Seelig. 1987. « ^2H -NMR Studies on Ether Lipid-rich Bacterial Membranes : Deuterium Order Profile of *Clostridium Butyricum*». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 899, p. 302-306.
- Johnson & Johnson Inc. 2012. «Polysporin Canada». En ligne. <<http://www.polysporin.ca/fr/p-ointment.asp>>. Consulté le 25 janvier.
- Jones, N. C., et M. J. Osborn. 1977a. «Interaction of *Salmonella typhimurium* with Phospholipid Vesicles». *J. Biol. Chem.*, vol. 252, no 20, p. 7398-7404.
- Jones, N. C., et M. J. Osborn. 1977b. «Translocation of Phospholipids between the Outer and Inner Membranes of *Salmonella typhimurium*». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 252, p. 7405-7412.

- Knoll, L. J., et J. I. Gordon. 1993. «Use of *Escherichia coli* Strains Containing *fad* Mutations plus a Triple Plasmid Expression System to Study the Import of Myristate, Its Activation by *Saccharomyces cerevisiae* Acyl-CoA Synthetase, and Its Utilization by *S. cerevisiae* Myristoyl-CoA:Protein N-Myristoyltransferase». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, p. 4281-4290.
- Kobayashi, T., M. Nishijima, Y. Tamori, S. Nojima, Y. Seyama et T. Yamakawa. 1980. «Acyl Phosphatidylglycerol of *Escherichia coli*». *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 620, p. 356-363.
- Kol, M. A., D. W.D. Kuster, H. A. Boumann, H. de Cock, A. J.R. Heck, B. de Kruijff et A. I. P. M. de Kroon. 2004. «Uptake and Remodeling of Exogenous Phosphatidylethanolamine in *E. coli*». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1636, p. 205-212.
- Koprivnjak, T., et A. Peschel. 2011. «Bacterial Resistance Mechanisms Against Host Defense Peptides». *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, p. 2243-2254.
- Kosa, M., et A. J. Ragauskas. 2011. «Lipids from Heterotrophic Microbes: Advances in Metabolism Research». *Trends in Microbiology*, vol. 29, p. 53-61.
- Levitt, M. H. 2001. *Spin Dynamics*. Chichester: John Wiley & Sons, p. 686
- Mansilla, M. C., L. E. Cybulski, D. Albanesi et D. de Mendoza. 2004. «Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors». *Journal of Bacteriology*, vol. 186, p. 6681-6688.
- Marcotte, I. (2011). Notes du cours PSL-6020 Structure et Transport Membranaires Méthodes de résonance magnétique nucléaire. Montréal, Université du Québec à Montréal
- Marcotte, L., J. Barbeau et M. Lafleur. 2005. «Permeability and Thermodynamics Study of Quaternary Ammonium Surfactants—Phosphocholine Vesicle System». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 292, p. 219-227.
- Marty, Y., F. Delaunay, J. Moal et J.-F. Samain. 1992. «Changes in the Fatty Acid Composition of *Pecten maximus* (L.) During Larval Development». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 163, p. 221-234.
- Matsuzaki, K. 2001. «Why and How are Peptide-Lipid Interactions Utilized for Self Defence?». *Biochemical Society Transactions*, vol. 29, p. 598-601.

- Mavis, R. D., et P. R. Vagelos. 1972. «The Effect of Phospholipid Fatty Acid Composition on Membranous Enzymes in *Escherichia coli*». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, p. 652-659.
- Morein, S., A.S. Andersson, L. Rilfors et G. Lindblom. 1996. «Wild-type *Escherichia coli* Cells Regulate the Membrane Lipid Composition in a “Window” between Gel and Non-lamellar Structures». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, p. 6801-6809.
- Mouget, J.-L. (2010). «Images prises par microscopi optique de différentes souches de diatomées bleues». Le Mans, Université du Maine
- Mouget, J.-L., R. Gastineau, O. Davidovich, P. Gaudin et N. Davidovich. 2009. «Light is a Key Factor in Triggering Sexual Reproduction in the Pennate Diatom *Haslea ostrearia*». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 69, p. 194-201.
- Mouget, J.-L., P. Rosa, C. Vachoux et G. Tremblin. 2005. «Enhancement of Marennine Production by Blue Light in the Diatom *Haslea ostrearia*». *Journal of Applied Phycology*, vol. 17, p. 437-445.
- Mouget, J.-L., G. Tremblin, A. Morant-Manceau, M. Morançais et J. M. Robert. 1999. «Long-term Photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): Effect of Irradiance on Growth Rates, Pigment Content and Photosynthesis». *European Journal of Phycology*, vol. 34, p. 109-115.
- Nakayama, T., K. Kaiya et S. Kumazawa. 2006. «Interaction of Plant Polyphenols with Liposomes». In *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*, p. 107-133.
- Nelson, M. L., M. C. Grier, S. E. Barbaro et M. Y. Ismail. 2009. «Polyfunctional Antibiotics Affecting Bacterial Membrane Dynamics». *Anti-Infective Agents in Medical Chemistry*, vol. 8, p. 3-16.
- Nichol, C. P., J. H. Davis, G. Weeks et M. Bloom. 1980. «Quantitative Study of the Fluidity of *Escherichia coli* Membranes Using Deuterium Magnetic Resonance». *Biochemistry*, vol. 19, p. 451-457.
- Nyström, S., P. Wallbrandt et A. Wieslander. 1992. «Membrane Protein Acylation». *European Journal of Biochemistry*, vol. 204, p. 231-240.
- Oreopoulos, J., R. F. Epand, R. M. Epand et C. M. Yip. 2010. «Peptide-Induced Domain Formation in Supported Lipid Bilayers: Direct Evidence by Combined Atomic Force and Polarized Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy». *Biophysical Journal*, vol. 98, p. 815-823.

- Organisation Mondiale de la Santé. 2012. «Tuberculose Aide-mémoire N104». En ligne. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>>. Consulté le 7 janvier
- Overbye, K. M., et J. F. Barrett. 2005. «Antibiotics: Where Did We Go Wrong?». *Drug Discovery Today*, vol. 10, p. 45-52.
- Pasquale, E. Di, C. Salmi-Smail, J. M. Brunel, P. Sanchez, J. Fantini et M. Maresca. 2010. «Biophysical Studies of the Interaction of Squalamine and Other Cationic Amphiphilic Molecules with Bacterial and Eukaryotic Membranes: Importance of the Distribution Coefficient in Membrane Selectivity». *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 163, p. 131-140.
- Pernet, F., et R. Tremblay. 2003. «Effect of Ultrasonication and Grinding on the Determination of Lipid Class Content of Microalgae Harvested on Filters». *Lipids*, vol. 38, p. 1191-1195.
- Pius, J., M. R. Morrow et V. Booth. 2012. «²H Solid-state NMR Investigation of Whole *Escherichia coli* Interacting with Antimicrobial Peptide MSI-78». *Biochemistry*, vol. 51, p. 118-125.
- Pouvreau, J.-B., E. Housson, L. Le Tallec, M. Morançais, Y. Rincé, J. Fleurence et P. Pondaven. 2007a. «Growth Inhibition of Several Marine Diatom Species Induced by the Shading Effect and Allelopathic Activity of Marennine, a Blue-green Polyphenolic Pigment of the Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 352, p. 212-225.
- Pouvreau, J.-B., M. Morançais, J. Fleurence et P. Pondaven. 2007b. «Method for the Quantification of the Blue-green Pigment "Marennine" Synthesized by the Marine Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen using HPLC Gel-filtration and Photodiode-array Detection». *Journal of Applied Phycology*, vol. 19, p. 263-270.
- Pouvreau, J.-B., M. Morançais, F. Fleury, P. Rosa, L. Thion, B. Cahingt, F. Zal, J. Fleurence et P. Pondaven. 2006a. «Preliminary Characterisation of the Blue-green Pigment "Marennine" from the Marine Tychopeagic Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen». *Journal of Applied Phycology*, vol. 18, p. 757-767.
- Pouvreau, J.-B., M. Morançais, G. Massé, P. Rosa, J.-M. Robert, J. Fleurence et P. Pondaven. 2006b. «Purification of the Blue-green Pigment "Marennine" from the Marine Tychopeagic Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen». *Journal of Applied Phycology*, vol. 18, p. 769-781.

- Pouvreau, J.-B., M. Morançais, F. Taran, P. Rosa, L. Dufossé, F. Guérard, S. Pin, J. Fleurence et P. Pondaven. 2008. «Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Marennine, a Blue-green Polyphenols Pigment from the Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen Responsible for the Natural Greening of Cultured Oysters». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, p. 6278-6286.
- Proulx, P., P. Hellion et J. Mackenzie. 1982. «Studies on the uptake of exogenous phosphoglycerides by *Escherichia coli* B cells». *Can. J. Biochem.*, vol. 60, p. 980-986.
- Ramamoorthy, A., S. Thennarasu, D.-K. Lee, A. Tan et L. Maloy. 2006. «Solid-State NMR Investigation of the Membrane-Disrupting Mechanism of Antimicrobial Peptides MSI-78 and MSI-594 Derived from Magainin 2 and Melittin». *Biophysical Journal*, vol. 91, no 1, p. 206-216.
- Rashid, Z. M., E. Lahaye, D. Defer, P. Douzenel, B. Perrin, N. Bourgougnon et O. Sire. 2009. «Isolation of a Sulphated Polysaccharide from a Recently Discovered Sponge Species (*Celtodoryx girardae*) and Determination of its Anti-herpetic Activity». *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 44, p. 286-293.
- Rietveld, A. G., J. A. Killian, W. Dowhanll et B. de Kruijff. 1993. «Polymorphic Regulation of Membrane Phospholipid Composition in *Escherichia coli*». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, p. 12427-12433.
- Robert, J.-M., M. Morançais, E. Pradier, J.-L. Mouget et G. Tremblin. 2002. «Extraction and Quantitative Analysis of the Blue-green Pigment "Marennine" Synthesized by the Diatom *Haslea ostrearia*». *Journal of Applied Phycology*, vol. 14, p. 299-305.
- Rock, C. O., et S. Jackowski. 1985. «Pathways for the Incorporation of Exogenous Fatty Acids into Phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, p. 12720-12724.
- Salt, W.G., et D. Wiseman. 1970. « The Relation Between the Uptake of Cetyltrimethylammonium Bromide by *Escherichia coli* and its Effects on Cell Growth». *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 22, p. 261-264.
- Sanders, C. R., et F. Sönnichsen. 2006. «Solution NMR of Membrane Proteins: Practice and Challenges». *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 44, p. 524-540.
- Seelig, J. 1977. «Deuterium Magnetic Resonance : Theory and Application to Lipid Membranes». *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 10, p. 353-418.

- Seelig, J., et P. M. Macdonald. 1987. «Phospholipids and Proteins in Biological Membranes. ^2H NMR as a Method To Study Structure, Dynamics, and Interactions». *Accounts of Chemical Research*, vol. 20, p. 221-228.
- Seelig, J., et A. Seelig. 1980. «Lipid Conformation in Model Membranes and Biological Membranes». *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 13, p. 19-61.
- Shaw, M. K., et J. L. Ingraham. 1965. «Fatty Acid Composition of *Escherichia coli* as a Possible Controlling Factor of the Minimal Growth Temperature». *Journal of Bacteriology*, vol. 90, p. 141-146.
- Shimizu, H., K. I. Nishiyama et H. Tokuda. 1997. «Expression of *gpsA* Encoding Biosynthetic sn-glycerol 3-phosphate Dehydrogenase Suppresses both the LB-phenotype of a *secB* Null Mutant and the Cold-sensitive Phenotype of a *secG* Null Mutant». *Molecular Microbiology*, vol. 26, p. 1013-1021.
- Silbert, D. F., M. Cohen et M. E. Harder. 1972. «The Effect of Exogenous Fatty Acids on Fatty Acid Metabolism in *Escherichia coli* K-12». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, p. 1699-1707.
- Silbert, D. F., F. Ruch et P. R. Vagelos. 1968. «Fatty Acid Replacements in a Fatty Acid Auxotroph of *Escherichia coli*». *Journal of Bacteriology*, vol. 95, p. 1658-1665.
- Silbert, D. F., et P. R. Vagelos. 1967. «Fatty Acid Mutant of *E. coli* Lacking a Beta-Hydroxydecanoyl Thioester Dehydrase». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 58, p. 1579-1586.
- Sinensky, M. 1971. «Temperature Control of Phospholipid Biosynthesis in *Escherichia coli*». *Journal of Bacteriology*, vol. 106, p. 449-455.
- Smith, P. B. W., A. P. Snyder et C. S. Harden. 1995. «Characterization of Bacterial Phospholipids by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry». *Analytical Chemistry*, vol. 67, p. 1824-1830.
- Strandberg, E., et A. S. Ulrich. 2004. «NMR Methods for Studying Membrane-Active Antimicrobial Peptides». *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, vol. 23A, p. 89-120.
- Tuchtenhagen, J., W. Ziegler et A. Blume. 1994. «Acyl Chain Conformational Ordering in Liquid-Crystalline Bilayers: Comparative FT-IR and ^2H -NMR Studies of Phospholipids Differing in Headgroup Structure and Chain Length». *European Biophysics Journal*, vol. 23, p. 323-336.

- Turpin, V., J. M. Robert, P. Gouletquer, G. Massé et P. Rosa. 2001. «Oyster Greening by Outdoor Mass Culture of the Diatom *Haslea ostrearia simonsen* in Enriched Seawater». *Aquaculture Research*, vol. 32, p. 801-809.
- Walsh, C. 2000. «Molecular Mechanisms that Confer Antibacterial Drug Resistance». *Nature*, vol. 406, p. 775-781.
- Wang, H., H. Cheng, F. Wang, D. Wei et X. Wang. 2010. «An Improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) Reduction Assay for Evaluating the Viability of *Escherichia coli* Cells». *Journal of Microbiological Methods*, vol. 82, p. 330-333.
- Warschawski, D. E., A. A. Arnold, M. Beaugrand, A. Gravel, É. Chartrand et I. Marcotte. 2011. «Choosing Membrane Mimetics for NMR Structural Studies of Transmembrane Proteins». *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 1808, p. 1957-1974.
- Watanabe, K., C. Ishikawa, H. Inoue, D. Cenhu, K. Yazawa et K. Kondo. 1994. «Incorporation of Exogenous Docosaehaenoic Acid into Various Bacterial Phospholipids». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 71, p. 325-330.
- Watts, A. 1998. «Solid-State NMR Approaches for Studying the Interaction of Peptides and Proteins with Membranes». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, vol. 1376, p. 297-318.
- Weber, M.H.W., W. Klein, L. Muller et U.M. NiesMarahiel. 2001. «Role of *Bacillus subtilis* Fatty Acid Desaturase in Membrane Adaptation During Cold Shock». *Molecular Microbiology*, vol. 39, p. 1321-1329.
- Wiese, A., M. Münstermann, T. Gutschmann, B. Lindner, K. Kawahara, U. Zähringer et U. Seydel. 1998. «Molecular Mechanisms of Polymyxin β -Membrane Interactions: Direct Correlation Between Surface Charge Density and Self-Promoted Transport». *Journal of Membrane Biology*, vol. 162, p. 127-138.
- Woodford, N., J. F. Turton et D. M. Livermore. 2011. «Multiresistant Gram-Negative Bacteria: The Role of High-Risk Clones in the Dissemination of Antibiotic Resistance». *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 35, p. 736-755.
- World Health Organisation. 1997. «Medical Impact of Use of Antimicrobial drugs in Food Animals». En ligne. <http://www.who.int/csr/don/1997_03_28/en/>. Consulté le 1 février.

Yoshiwa, W., H. Akutsa et Y. Kyoku. 1988. «A 2H-NMR Study on the Glycerol Backbone of Phospholipids Extracted from *Escherichia coli* Grown Under High Osmotic Pressure : Evidence for Multiconformations of Phosphatidylethanolamine». *Biochemica et Biophysica Acta*, vol. 944, p. 321-328.

Zhang, Y.-M., et C. O. Rock. 2008. «Membrane Lipid Homeostasis in Bacteria». *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, p. 222-233.