

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

KARIM TRIKI

Ingénieur en agro-alimentaire

CARACTÉRISATION PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE  
DES COMPLEXES PHYTOCHÉLATINES-CUIVRE  
CHEZ *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

JUIN 1997



### **Mise en garde/Advice**

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

## RÉSUMÉ

La culture d'algues de type *Scenedesmus quadricauda* avec et sans cuivre a déjà été effectuée pour des travaux antérieurs par Saint-Pierre (1993). Les douze échantillons prélevés ont été conservés, lyophilisés et congelés.

Après la remise en solution de nos échantillons, le fractionnement de ceux-ci a été effectué sur une colonne chromatographique de perméation sur gel Séphadex G-25. Le contenu de la fraction 10 de chaque échantillon contient le pic correspondant aux polypeptides de faible masse moléculaire a été analysé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Les résultats obtenus par chromatographie sur gel démontrent que les protéines des échantillons témoins et expérimentaux possèdent une très faible masse moléculaire comprise entre 400 et 1000 daltons.

Tous les spectres infrarouges des échantillons ont présenté quatre importantes régions d'absorbance  $800-900\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650-1750\text{ cm}^{-1}$  et  $2700-2800\text{ cm}^{-1}$ . Après une comparaison visuelle minutieuse entre les spectres des échantillons sans cuivre et ceux avec cuivre, l'existence et l'absence de certains pics ont été enregistrés.

Les sept nouveaux pics observés dans les spectres de cinq échantillons expérimentaux peuvent correspondre à des déplacements des vibrations des fonctions amides, CO, NH<sub>2</sub> et du groupe NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ce qui permet de supposer que la complexation des protéines avec le cuivre a été effectuée par l'intermédiaire de ces fonctions amides.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce travail. Ces remerciements sont adressés principalement à mon directeur de recherche, Monsieur Denis Bussières pour sa grande disponibilité et son soutien moral et intellectuel au cours de la réalisation de ce projet. Je remercie Monsieur Raynald Côté, codirecteur pour le support moral qu'il m'a fourni.

En terminant, je voudrais remercier beaucoup mes parents et ma soeur qui m'ont offert la chance d'entreprendre des études de deuxième cycle hors de mon pays.

## TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ .....	ii
REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
CHAPITRE I. INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	5
2.1 Traitement des échantillons .....	6
2.2 Chromatographie des échantillons .....	7
2.2.1 Montage de la colonne chromatographique .....	7
2.2.2 Etalonnage de la colonne chromatographique .....	8
2.2.3 Application des échantillons sur la colonne chromatographique .....	8
2.3 Spectroscopie infrarouge .....	12
2.3.1 Appareil utilisé .....	12
2.3.2 Préparation des solutions connues et des échantillons .....	13
2.3.3 Mode opératoire .....	13
CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	16
3.1 Chromatogrammes des protéines extraites des cellules .....	17
3.2 Spectres d'absorbance .....	26
3.2.1 Spectres infrarouges pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	39
3.2.2 Spectres infrarouges pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	49
3.2.3 Spectres infrarouges pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	60
3.2.4 Spectres infrarouges pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	71
CHAPITRE IV. CONCLUSION .....	84
RÉFÉRENCES .....	87

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Schéma du dispositif expérimental de la chromatographie sur gel .....	9
Figure 2. Profils d'élution des protéines étalons .....	10
Figure 3. Courbe d'étalonnage de la colonne chromatographique .....	11
Figure 4. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 12 heures .....	18
Figure 5. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 84 heures .....	20
Figure 6. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 156 heures .....	21
Figure 7. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 324 heures .....	22
Figure 8. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 516 heures .....	24
Figure 9. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 732 heures .....	25
Figure 10. Spectres à simple faisceau du même échantillon de Tris-HCl: (A) pris à 19 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	27
Figure 11. Spectres à simple faisceau du même échantillon de Tris-HCl: (A) pris à 19 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	27
Figure 12. Spectres à simple faisceau du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	28
Figure 13. Spectres à simple faisceau du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	28
Figure 14. Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	31
Figure 15. Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	31

Figure 16.	Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	32
Figure 17.	Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	32
Figure 18.	Spectres infrarouges de l'acide oxalique (A) sans cuivre; (B) en présence de 100 ppb; (C) en présence de 500 ppb; (D) en présence de 2 ppm de cuivre pour la région 1000-2000 $\text{cm}^{-1}$ .....	34
Figure 19.	Spectres infrarouges de l'acide oxalique (A) sans cuivre; (B) en présence de 100 ppb; (C) en présence de 500 ppb; (D) en présence de 2 ppm de cuivre pour la région 1610-1660 $\text{cm}^{-1}$ .....	34
Figure 20.	Spectres infrarouges de l'acide oxalique (A) sans cuivre; (B) en présence de 100 ppb; (C) en présence de 500 ppb; (D) en présence de 2 ppm de cuivre pour la région 1640-1680 $\text{cm}^{-1}$ .....	35
Figure 21.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	41
Figure 22.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	42
Figure 23.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	43
Figure 24.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	44
Figure 25.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	45
Figure 26.	Spectres infrarouges des proéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	46
Figure 27.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i>	

	après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	50
Figure 28.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	51
Figure 29.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	52
Figure 30.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	53
Figure 31.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	54
Figure 32.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	55
Figure 33.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	61
Figure 34.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	62
Figure 35.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	63
Figure 36.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	64
Figure 37.	Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	65



Figure 38. Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	66
Figure 39. Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	72
Figure 40. Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	73
Figure 41. Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	74
Figure 42. Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	75
Figure 43. Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	76
Figure 44. Spectres infrarouges des protéines de cellules de <i>Scenedesmus quadricauda</i> après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	77

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I. Pics disparus pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	47
Tableau II. Nouveaux pics pour la région 800-900 $\text{cm}^{-1}$ .....	47
Tableau III. Pics disparus pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	57
Tableau IV. Nouveaux pics pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	57
Tableau V. Pics disparus pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	68
Tableau VI. Nouveaux pics pour la région 1650-1750 $\text{cm}^{-1}$ .....	68
Tableau VII. Pics disparus pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	78
Tableau VIII. Nouveaux pics pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$ .....	78

**CHAPITRE I**  
**INTRODUCTION**

Tous les organismes vivants de la planète ont besoin d'une quantité minimale de nutriments contenant des métaux. Au-delà de ce minimum, la présence métallique peut devenir rapidement toxique même létale. La nature a développé des mécanismes de défense envers ces agents toxiques comme la production de protéines ou polypeptides pouvant complexer, chélater ou séquestrer ces métaux à l'intérieur de la cellule. Ce type de molécules peut s'appeler des métallothionéines (MT) pour les organismes supérieurs ou encore des phytochélatines (PC) pour les plantes et organismes inférieurs.

Les méthodes actuellement employées en écotoxicologie peuvent déterminer la toxicité relative de divers polluants envers certains ou plusieurs organismes. Certaines de ces méthodes emploient donc des cellules phytoplanctoniques capables d'ajustements métaboliques permettant de générer des effets rapides de tolérance.

Le cuivre est considéré comme un oligo-élément essentiel à la croissance et au bon fonctionnement des réactions métaboliques (Salisbury et Ross, 1985; Grill et *al.*, 1988). Cependant le cuivre demeure un des métaux lourds les plus toxiques à des doses supraoptimales pour le phytoplancton (Bastien, 1986; Fernandes et Henriques, 1991).

Le phytoplancton joue un rôle fondamental dans le cycle du carbone de la biosphère et l'on

admet que la quantité de CO<sub>2</sub> qu'il transforme chaque année en matière organique par photosynthèse est très considérable. L'effet des métaux sur la physiologie du phytoplancton laissera son empreinte sur l'ensemble de la productivité biologique de l'écosystème. Certains travaux (Turner et Marshall, 1972; Stokes et *al.*, 1977; Wagner et Krotz, 1989) ont montré que les cellules phytoplanctoniques développent des mécanismes de tolérance envers certains métaux lourds. Turner et Marshall (1972) ont montré que ce mécanisme consiste en une élaboration d'une certaine complexation des métaux à l'intérieur de la paroi cellulaire tandis que Wagner et Krotz (1989) l'ont observé dans les vacuoles. D'autres chercheurs ont montré que la complexation a été effectuée par des composés organiques dans le cytoplasme (Ernst, 1975; Grill et *al.*, 1988).

Jusqu'à maintenant, les analyses visant à confirmer la présence de protéines de type métallothionéine ou phytochélatine, complexant les métaux, sont longues et fastidieuses. Le développement d'une méthodologie pouvant mesurer ces molécules plus rapidement devrait permettre une plus grande utilisation de ces tests écotoxicologiques.

La culture d'algues de type *Scenedesmus quadricauda* a été effectuée par Saint-Pierre (1993) lors d'une expérience d'une durée de 30,5 jours. Les échantillons à étudier ont été récoltés dans des aliquotes de 250 ml après une période de 12, 84, 156, 324, 516 et 732 heures dans un milieu de culture contaminé avec 250 ppb de cuivre; dans chaque cas un échantillon en serait de témoin. Au cours de ses expériences, Saint-Pierre (1993) a observé une localisation constante du cuivre dans les dernières fractions chromatographiques extraites des cellules du ballon expérimental, ce qui supporte l'existence de polypeptides complexants chez *S. quadricauda* suite à une intoxication au cuivre. Ces résultats expérimentaux mettent en évidence un mécanismes d'adaptation aux ions métalliques chez *S. quadricauda*. Un tel stress

environnemental peut se produire dans un milieu naturel et avoir des conséquences néfastes sur l'écosystème.

La plupart des études qui ont été poursuivies sur les métallothionéines ou phytochélatines où il y a eu recours à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) étaient orientées sur la structure secondaire des protéines. En effet, certains chercheurs supposent que les phytochélatines forment des complexes avec le cuivre à l'aide principalement des groupes sulfurés des acides aminés de cystéine (De Vos et *al.*, 1992; Speiser et *al.*, 1992; Dave et *al.*, 1993). D'autres chercheurs ont remarqué que la complexation pourrait s'effectuer à partir des groupes  $\text{NH}_2$  de certains acides aminés (Rao, 1963; Nestor et *al.*, 1984; Sykes, 1991) et les groupes carboxyliques  $\text{COOH}$  (Strand et Jakobsen, 1991; Jackson et Mantsh, 1995). Les acides aminés de ces phytochélatines sont principalement la glutamine, la cystéine, la glycine et, à un degré moindre, l'histidine.

Nos travaux ont pour but d'évaluer le potentiel de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) pour identifier les phytochélatines et mettre en évidence la présence des complexes cuivre-polypeptides chez *S.quadricauda*, suite à une exposition à long terme au cuivre.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Traitement des échantillons

Deux milieux de culture, un expérimental et un témoin, ont été placés dans une chambre où la température a été maintenue entre 22°C et 26°C avec une photopériode de 16:8. L'utilisation d'un système de culture en continu employant des pompes péristaltiques a facilité la récolte des aliquotes de 250 ml après 12, 84, 156, 324, 516 et 732 heures des deux milieux de culture. Chaque aliquote a été filtrée sur un système Millipore et rincée avec un tampon Tris-HCl 0,01 M de pH 8,6, contenant 10 mM de 2-mercaptoéthanol et 0,02 % d'azote de sodium. L'aliquote filtrée a été ensuite remise en solution dans un volume de 30 ml de ce même tampon Tris-HCl. Par la suite, chaque échantillon a subi un traitement aux ultrasons afin d'ouvrir les cellules de *S.quadricauda*. Une ultracentrifugation de 90 minutes à une force de 100 000 g et à une température de 4°C a été effectuée sur les échantillons homogénéisés afin de sédimenter les débris cellulaires (membranes, ribosomes) et les cellules non ouvertes. Les surnageants obtenus ont été récoltés dans des contenants pour la lyophilisation à -55°C et durant plus de 24 heures. Une fois lyophilisés, les échantillons ont été déposés dans des contenants propres puis placés dans un dessiccateur au congélateur à une température de -22°C. Le dégel de ces surnageants a été effectué lentement dans le réfrigérateur à une température de 4°C avant leur application sur la colonne chromatographique par perméation sur gel.



## 2.2 Chromatographie des échantillons

La technique de la chromatographie sur gel est une méthode pour séparer des substances mélangées. Le fractionnement est surtout le résultat des différences de grosseur des molécules et par conséquence, des masses moléculaires (Determann, 1969).

### 2.2.1 Montage de la colonne chromatographique

Pour obtenir des résultats reproductibles, il faut veiller au choix d'une colonne avec des critères adéquats pour le travail à effectuer. Pour cela, nous avons opté pour une colonne Pharmacia, modèle C 16 / 70, d'un diamètre de 16 mm et d'une longueur de 70 cm. Le remplissage de la colonne a été effectué à l'aide d'une pipette pasteur et le tassement du gel est réalisé grâce à la circulation du tampon Tris-HCl par l'extrémité supérieure de la colonne. D'après les recommandations de Saint-Pierre (1993), nous avons opté pour un gel plus performant, le gel Séphadex G 25 de qualité fine; ce gel a comme limites d'exclusion, les masses moléculaires se situant entre 1 000 et 5 000 daltons (Da). Le gonflement total du Séphadex est une condition essentielle pour son utilisation (Determann, 1969); le gel a été mis à gonfler pendant 3 heures à la température ambiante dans un tampon Tris-HCl 0,01 M à pH 7 car le Séphadex est stable en milieu alcalin ou légèrement acide. Pour assurer une élution constante, une pompe péristaltique (LKB de type 2132) a été utilisée; le débit de la pompe a été calibré de manière à obtenir une vitesse d'élution de 24 ml par heure. Un détecteur ultraviolet (LKB de type 2138) muni d'un filtre centré à une longueur d'onde de 280 nm avec une source lumineuse au mercure, permet de suivre l'élution des différents composants d'un échantillon. Ce détecteur ultraviolet est relié à un enregistreur BBC Goerz Metrawatt (modèle SE 120); un collecteur de fraction ISCO (Instrumentation Specialities

CO, Lincoln, Modèle 2080, USA) est réglé de manière à récolter des volumes de 12 ml dans des éprouvettes à toutes les 30 minutes (Figure 1).

### 2.2.2 Étalonnage de la colonne chromatographique

Pour s'assurer de l'intégrité de notre colonne, nous avons utilisé le bleu Dextran (masse moléculaire de 2 000 000 Da) afin de favoriser le tassement du gel et vérifier son homogénéité. Ensuite, au moyen d'une seringue, nous avons injecté les protéines étalons, une par une, par ordre décroissant de masse moléculaire: Aprotinine (masse moléculaire de 6 500 Da), Insuline-chaîne B (masse moléculaire de 3 495,9 Da), Angiosténine (masse moléculaire de 1 002,2 Da) et enfin un sel d'acétate de formule  $C_{22}H_{41}N_7O_8S_3$  (masse moléculaire de 627,8 Da). Ces quatre protéines provenant de chez Sigma Chemicals ont servi à l'étalonnage de notre colonne chromatographique (Figures 2 et 3). Nous avons utilisé la masse moléculaire du  $C_{22}H_{41}N_7O_8S_3$  pour l'étalonnage de la colonne car son chromatogramme a donné des résultats qui sont en concordance avec ceux des autres protéines étalons. La courbe d'étalonnage de la colonne chromatographique est constituée du logarithme des masses moléculaires en fonction du temps d'élution de ces protéines étalons (Figure 3).

### 2.2.3 Application des échantillons sur la colonne chromatographique

Après avoir effectué l'étalonnage de la colonne chromatographique, nous avons élué du tampon Tris-HCl durant 6 heures afin de s'assurer qu'elle soit très bien rincée. Après avoir laissé dégeler très lentement tous les surnageants à 4°C, nous avons injecté ceux provenant du ballon témoin avant ceux provenant du ballon expérimental afin d'éviter toute contamination de nos surnageants témoins par le cuivre. Les échantillons ont été appliqués sur la colonne avec

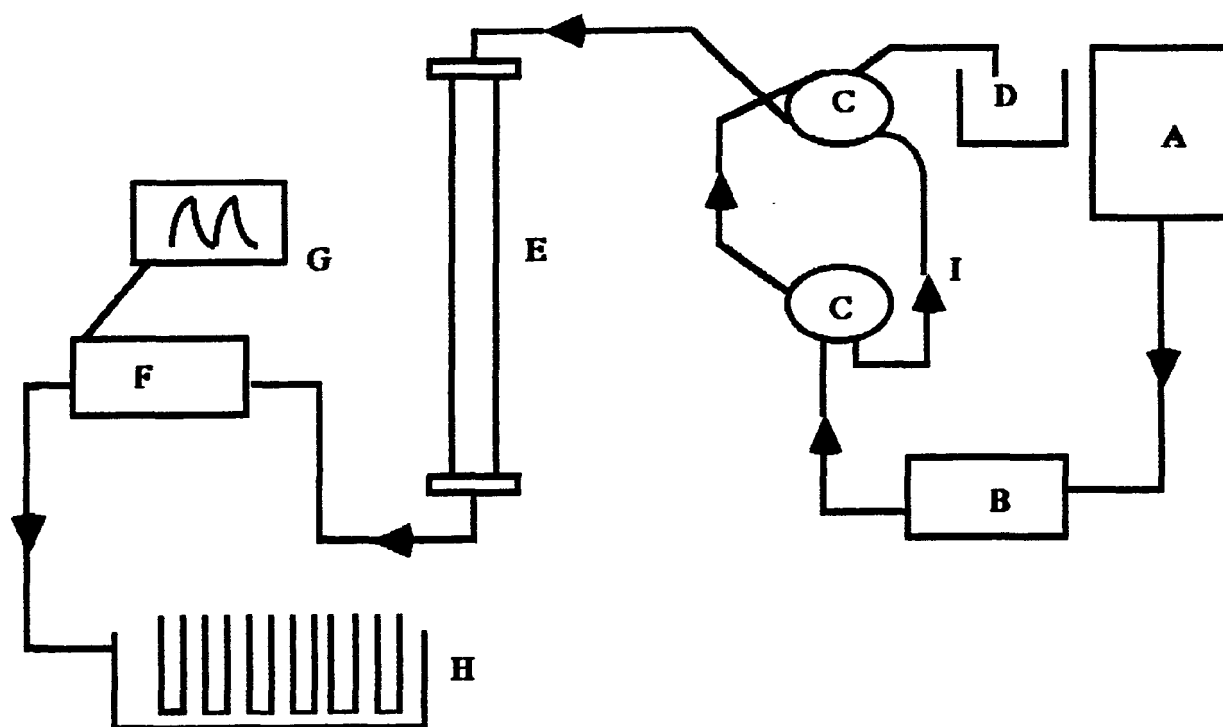


Figure 1. Schéma du dispositif expérimental de la chromatographie sur gel.  
 ( A ) Réservoir de l'éluant , ( B ) Pompe , ( C ) Valve , ( D ) Bêcher pour le surplus  
 ( E ) Colonne chromatographique , ( F ) Détecteur ultraviolet , ( G ) Enregistreur  
 ( H ) Collecteur de fraction et ( I ) Boucle d'injection.

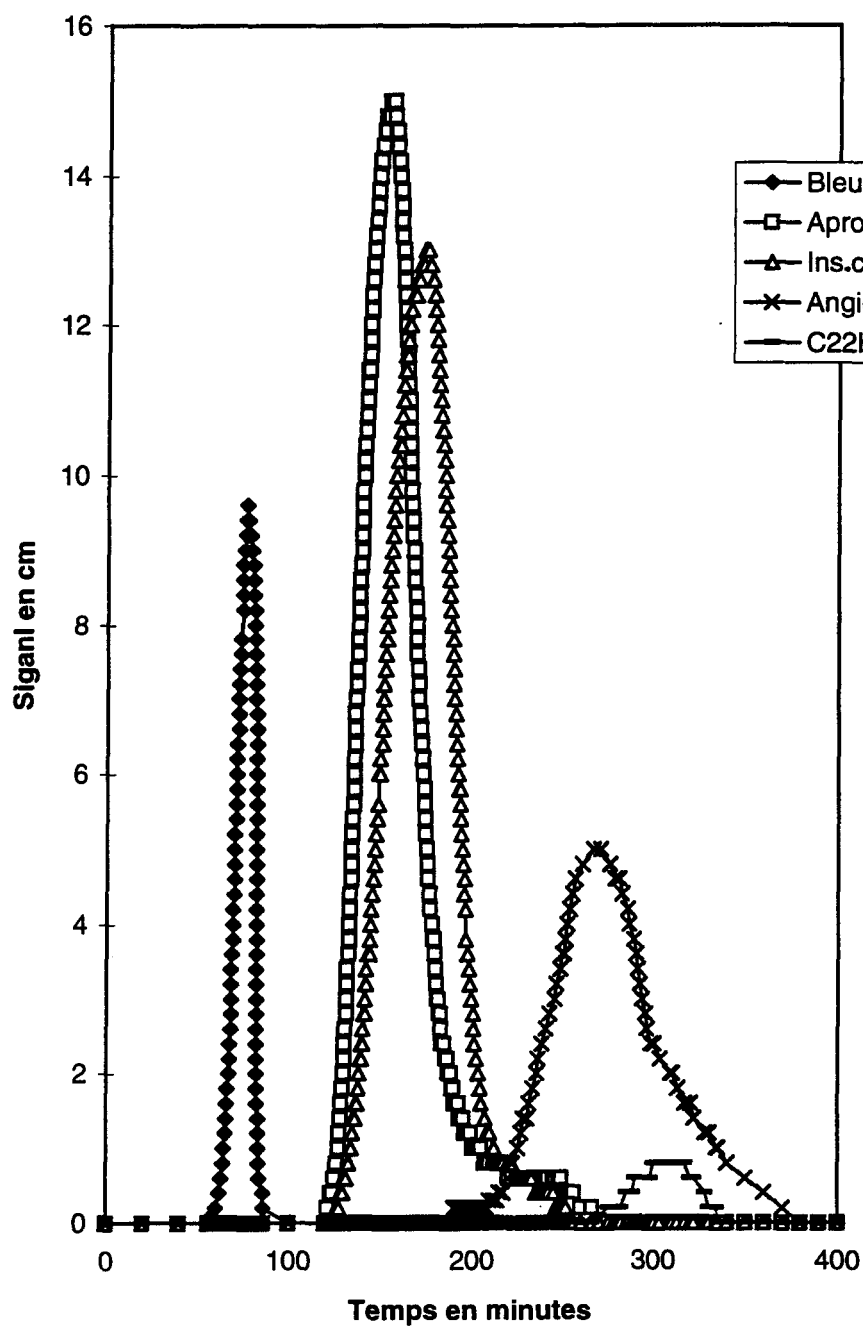


Figure 2. Profils d'élution des protéines étalons.

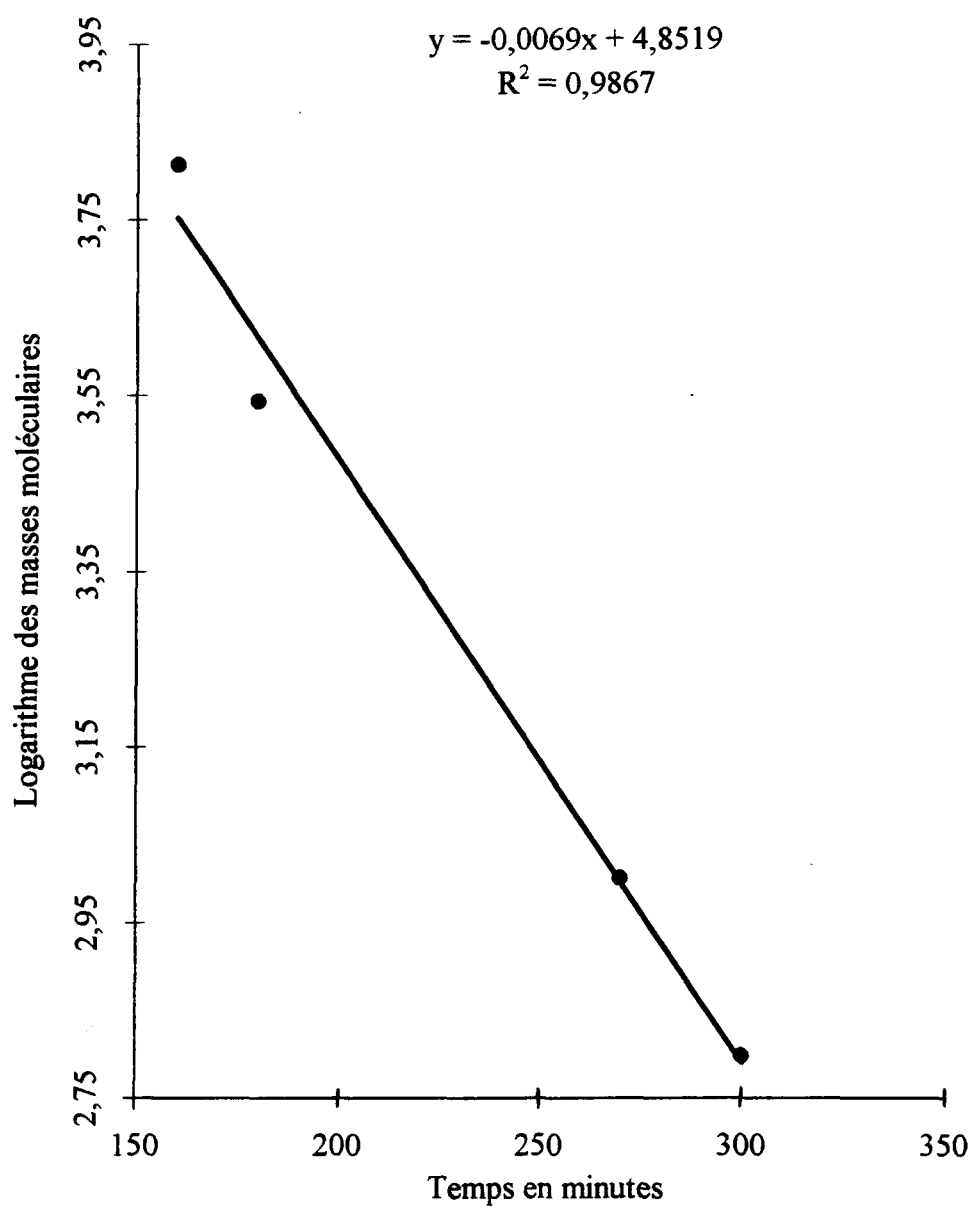


Figure 3. Courbe d'étalonnage de la colonne chromatographique.

une seringue via une boucle d'injection d'environ 1,0 ml. Le surnageant de l'échantillon témoin après 12 heures fait exception : seulement 0,8 ml a été utilisé pour une deuxième injection, la première ayant été rendu inutilisable suite à un problème technique. Les chromatogrammes des différents échantillons ont été obtenus de la même manière que ceux des protéines étalons. L'étude des chromatogrammes de nos échantillons, nous a permis d'opter pour la fraction 10 qui contient le pic correspondant aux polypeptides de faible masse moléculaire.

### 2.3 Spectroscopie infrarouge

Dans notre travail, la méthode utilisée pour analyser les fractions chromatographiques de nos échantillons est la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. L'infrarouge est la région du spectre électromagnétique où se retrouvent les fréquences vibrationnelles et rotationnelles des molécules. Le principe repose sur le fait que, lorsque la molécule est en présence de lumière infrarouge à la fréquence où elle peut entrer en résonance, elle absorbe de l'énergie et l'amplitude de ses vibrations est augmentée. Donc, à ces fréquences, le rayonnement infrarouge est en partie absorbé et moins intense; nous parlerons de fréquence d'absorption ou de vibration.

#### 2.3.1 Appareil utilisé

Nos spectres infrarouges furent mesurés avec un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de Midac Corporation, Modèle M 2010, muni de l'accessoire de réflectance totale atténuée (ATR) avec un cristal de ZnSe biseauté à 45°. L'appareil est aussi muni de fenêtres en KBr et un détecteur de type DTGS. Le FTIR MIDAC utilise un interféromètre de type Michelson et un ordinateur PC compatible

contrôlé par le logiciel Lab Calc version 2.23 de Galactic Industries Corporation pour l'acquisition des données et leur manipulation. L'interféromètre de Michelson effectue des balayages rapides pour produire l'interférogramme; celui-ci est un signal obtenu en fonction du temps par l'appareil infrarouge. L'application de la transformée de Fourier sur l'interférogramme transforme ce signal en fonction du nombre d'ondes pour donner le spectre à simple faisceau (Single beam). Pour tous les échantillons, nous avons enregistré et conservé les spectres à simple faisceau représentant les variations de l'intensité du signal, désignée par  $I$ , en fonction du nombre d'ondes. Préalablement, nous avons enregistré avant chaque échantillon le spectre à simple faisceau du tampon seul,  $I_0$ . Avec le logiciel, nous avons obtenu le spectre conventionnel ou de transmittance, calculé en effectuant le rapport  $T = I / I_0$ . Ce rapport peut être exprimé par l'absorbance,  $A = -\text{Log } T$ , qui est directement utilisée par la suite pour l'analyse de nos spectres.

### 2.3.2 Préparation des solutions connues et des échantillons

Pour mieux cibler notre analyse, nous avons préparé adéquatement et démontré l'effet des ions cuivriques,  $\text{Cu}^{2+}$  sur les groupes acides  $\text{R-COOH}$  et nous avons préparé une solution d'acide oxalique à 10% avec de l'eau déminéralisée. Dans des portions de la solution d'acide oxalique, nous avons ajouté différentes concentrations de cuivre, soit 100 ppb, 500 ppb, 2 ppm et 10 ppm de  $\text{Cu}^{2+}$  en solution.

### 2.3.3 Mode opératoire

Avant d'analyser nos échantillons, il faut veiller à ce que la cuvette à échantillon soit toujours bien nettoyée après chaque manipulation tout en évitant la présence des bulles d'air

dans notre échantillon. Pour la prise des spectres, nous avons utilisé une résolution de  $1\text{ cm}^{-1}$ , un gain de 64 pour éviter la saturation du détecteur et 128 balayages. En premier lieu, nous avons déposé du tampon Tris-HCl dans l'accessoire ATR afin d'acquérir son interférogramme pour obtenir son spectre à simple faisceau. La prise des spectres à simple faisceau des échantillons a été effectuée de la même manière que celle du Tris-HCl. Il faut mentionner que la prise de spectre à simple faisceau de l'échantillon témoin et celle de l'échantillon expérimental sera toujours précédée par une prise de spectre à simple faisceau de Tris-HCl qui sera utilisée par le logiciel comme spectre de référence dans le calcul du spectre d'absorbance de l'échantillon témoin ou expérimental.

En spectroscopie infrarouge, nous pouvons utiliser plusieurs procédures d'analyse et de traitement pour comparer nos spectres. Nous avons essayé les méthodes de déconvolution, de dérivée première, de dérivée deuxième, de soustraction et la traditionnelle méthode de comparaison visuelle, cela sur les spectres d'absorbance de nos échantillons.

La méthode de la dérivée première a été appliquée sur quelques spectres pour aussitôt s'apercevoir que cela provoquait un déplacement majeur des pics c'est-à-dire de quelques  $\text{cm}^{-1}$  pour chacun. Une telle déviation introduisait alors un biais tout à fait inacceptable et alors, nous avons délaissé cette méthode. Nous avons utilisé la méthode de déconvolution disponible avec le logiciel selon une fonction Bessel sur 9 points (ou  $4,5\text{ cm}^{-1}$ ). Encore là, ceci impliquait le déplacement des pics de manière indésirable et cette méthode a été mise de côté.

L'application de la méthode de dérivée seconde sur 9 points ( $4,5\text{ cm}^{-1}$ ) des spectres d'absorbance nous a alors semblé être très intéressante. Tous les spectres ont été traités pour



ensuite nous apercevoir que plusieurs pics, et non pas tous, étaient déplacés ou tout simplement disparus. Cette perte d'information et surtout ce biais irrégulier étant inacceptables; cette méthode a également été mise de côté. La soustraction directe du spectre d'absorbance de l'échantillon expérimental moins celui du témoin a également été tentée. Le spectre résultant nous donnait alors plusieurs faibles pics très différents de ceux du spectre de l'échantillon. Nous avons alors interprété ceux-ci comme étant possiblement dus à l'ajout du bruit de fond du spectre du témoin. Il ne faut pas oublier qu'ici nous manipulons deux spectres d'absorbance n'ayant pas été enregistrés nécessairement tout de suite l'un après l'autre, chacun de ceux-ci étant issus de deux spectres à simple faisceau. La soustraction des deux spectres n'est pas considérée comme la méthode idéale lorsqu'il y a un bruit de fond irrégulier. Cette méthode a également été mise de côté.

Le lissage des spectres par une fonction Stavinski-Golay sur 13 points ( $6,5 \text{ cm}^{-1}$ ) ne nous a pas donné plus de résultats clairs. La disparition de plusieurs pics et la formation de nouveaux pics a justifié l'abandon de cette méthode. Face à ces échecs, nous avons finalement opté pour la traditionnelle comparaison visuelle entre certaines régions des spectres d'absorbance de l'échantillon expérimental et celles du témoin, pour un même temps d'échantillonnage. Cette méthode est très fastidieuse et exigeante pour aboutir à une compilation valable des différences entre les spectres mais elle permet d'évaluer autant la position que la différence d'intensité et de forme de ceux-ci.

**CHAPITRE III**  
**RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### 3.1 Chromatogrammes des protéines extraites des cellules

Dans un premier temps, nous avons enregistré les chromatogrammes des protéines extraites des cellules du ballon témoin et ensuite nous avons enregistré les chromatogrammes des protéines des cellules du ballon expérimental dans un milieu de culture contaminé par 250  $\mu\text{g}$  de cuivre par litre (250 ppb de Cu) .

Chacune des figures 4 à 9 présente deux chromatogrammes, un qui concerne les protéines extraites des cellules du ballon témoin (A) et l'autre, les protéines extraites des cellules du ballon expérimental (B), pour un même temps expérimental.

#### Après 12 heures

Le profil d'élution des protéines extraites des cellules du ballon témoin ne présente pas le premier pic qui correspond à la limite d'exclusion (Figure 4). Les deux pics de la limite de perméation sont identiques et relativement superposables. La hauteur du signal est beaucoup plus élevée chez les cellules du ballon expérimental que chez les cellules du ballon témoin (Figure 4).

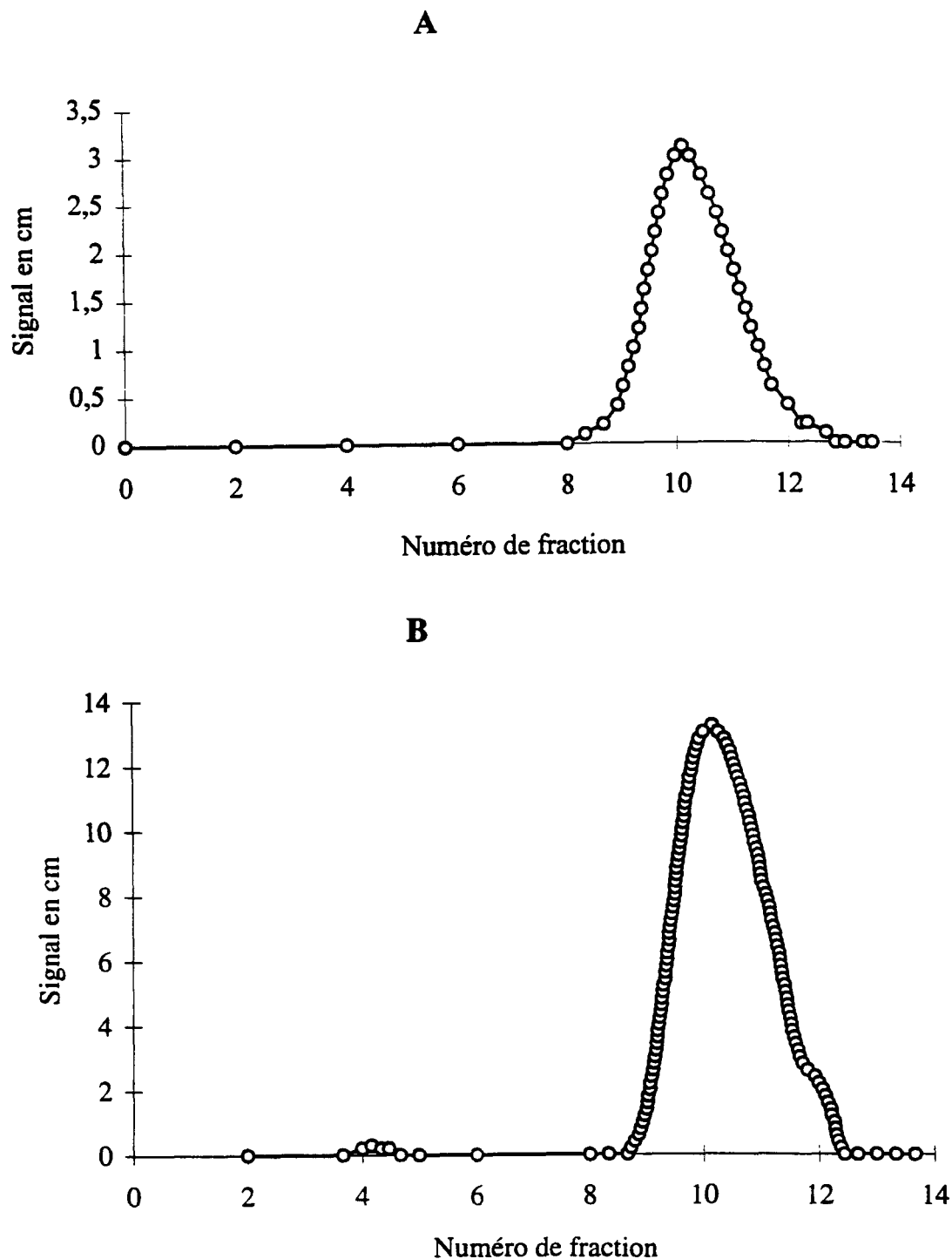


Figure 4. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 12 heures.

( A ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules sans cuivre.

( B ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules en présence de 250 ppb de cuivre.

### Après 84 heures

Les deux profils d'élution des protéines extraites sont presque identiques et superposables (Figure 5). Mais nous observons que la hauteur du signal chez les cellules du ballon témoin est plus élevée que celle des cellules du ballon expérimental

### Après 156 heures

La figure 6 présente les deux profils d'élution des protéines extraites du ballon témoin et celles extraites du ballon expérimental. Le ballon témoin présente deux pics tandis que le ballon expérimental n'en présente qu'un seul. Les deux pics de la limite de perméation sont quasiment identiques et superposables. La hauteur du signal est légèrement plus élevée pour le ballon témoin que pour le ballon expérimental.

### Après 324 heures

A l'examen des profils d'élution des protéines extraites des cellules du ballon témoin et expérimental nous remarquons une absence du premier pic d'exclusion (Figure 7) et les deux tracés sont identiques et superposables bien que le pic de la limite de perméation semble légèrement plus étendu chez les protéines extraites des cellules du ballon témoin. La hauteur du signal est légèrement plus élevée chez le pic des protéines extraites des cellules du ballon témoin.

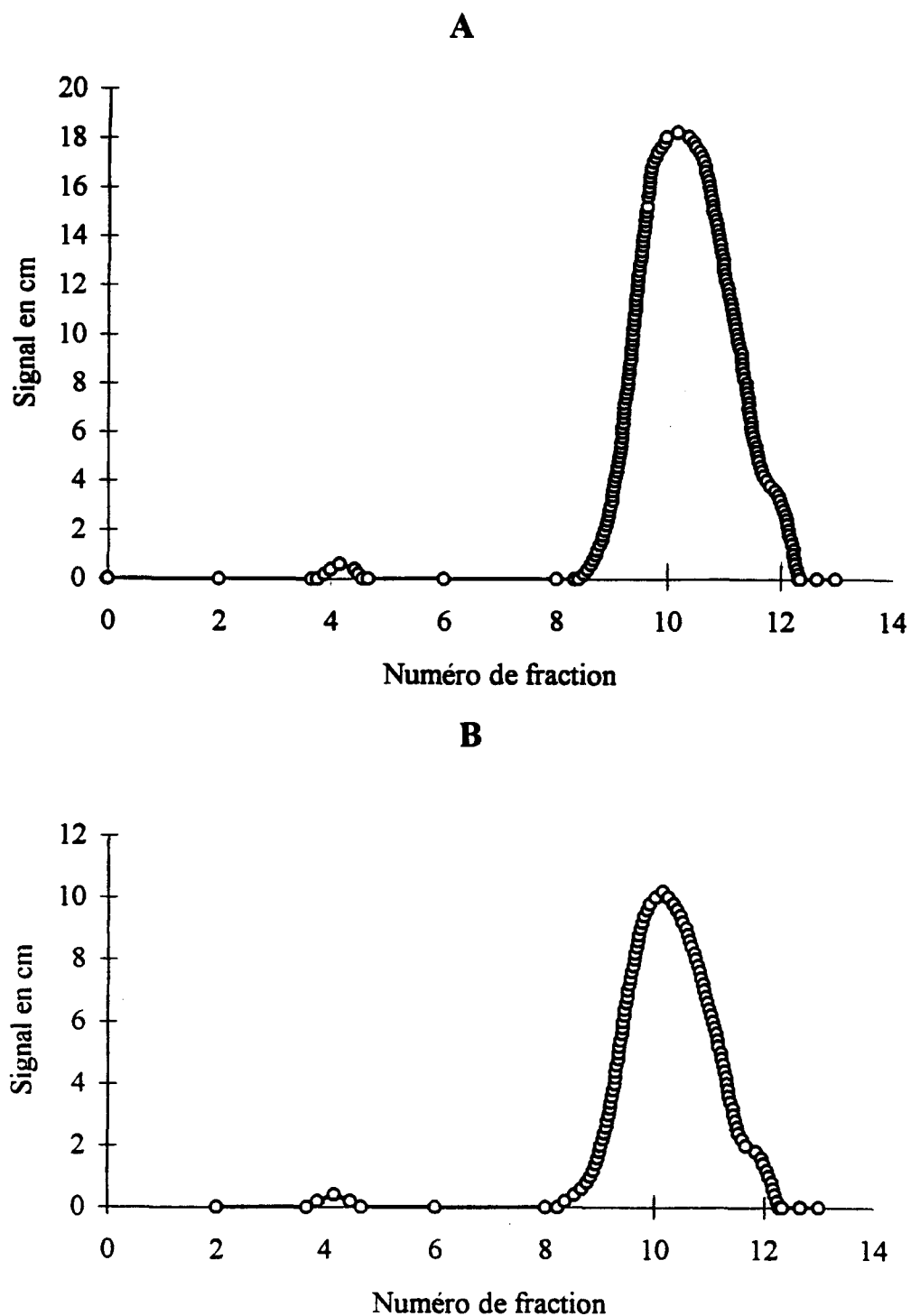


Figure 5. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 84 heures.  
( A ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules sans cuivre.  
( B ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules en présence de 250 ppb de cuivre.

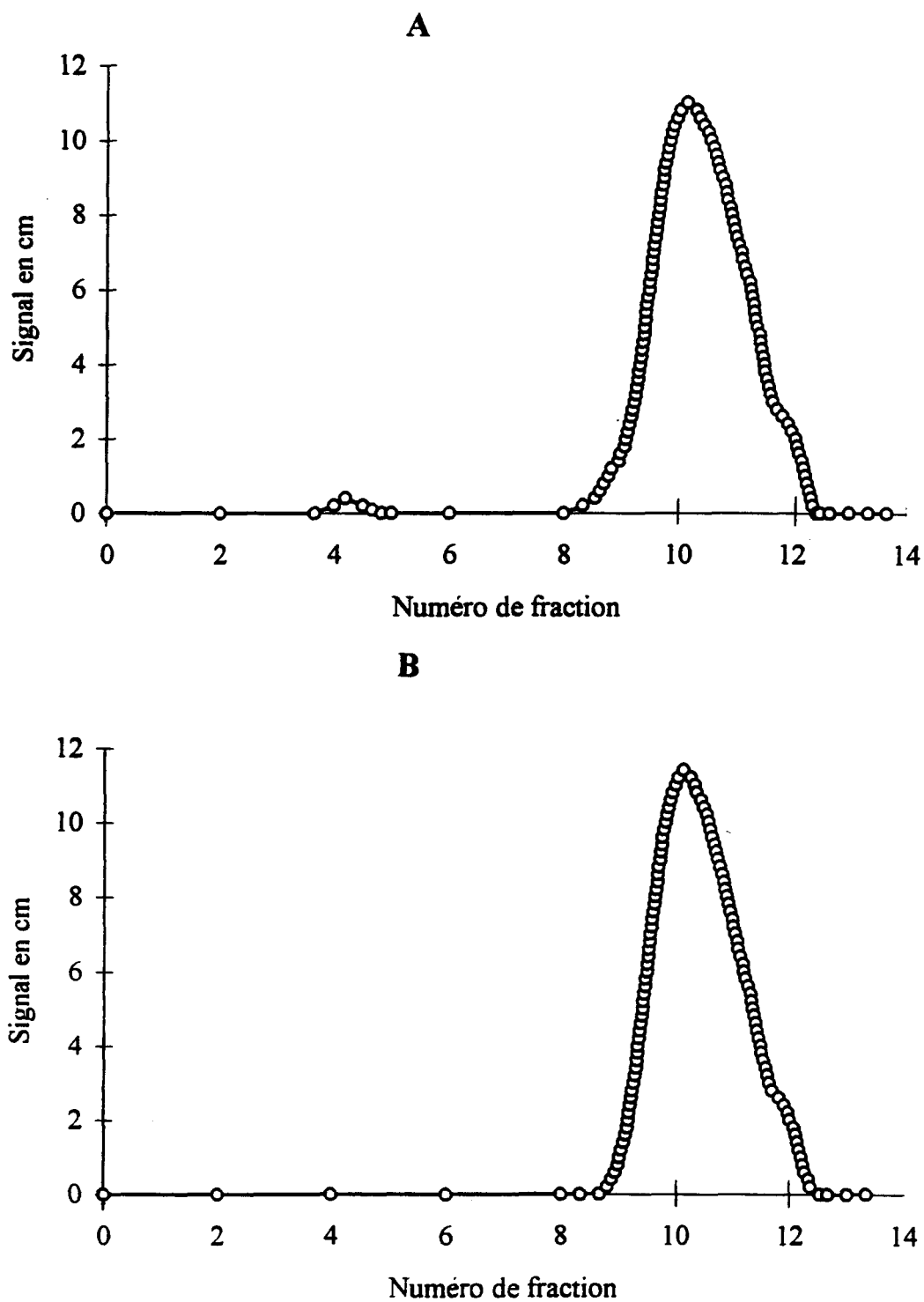


Figure 6. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 156 heures.  
( A ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules sans cuivre.  
( B ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules en présence de 250 ppb de cuivre.

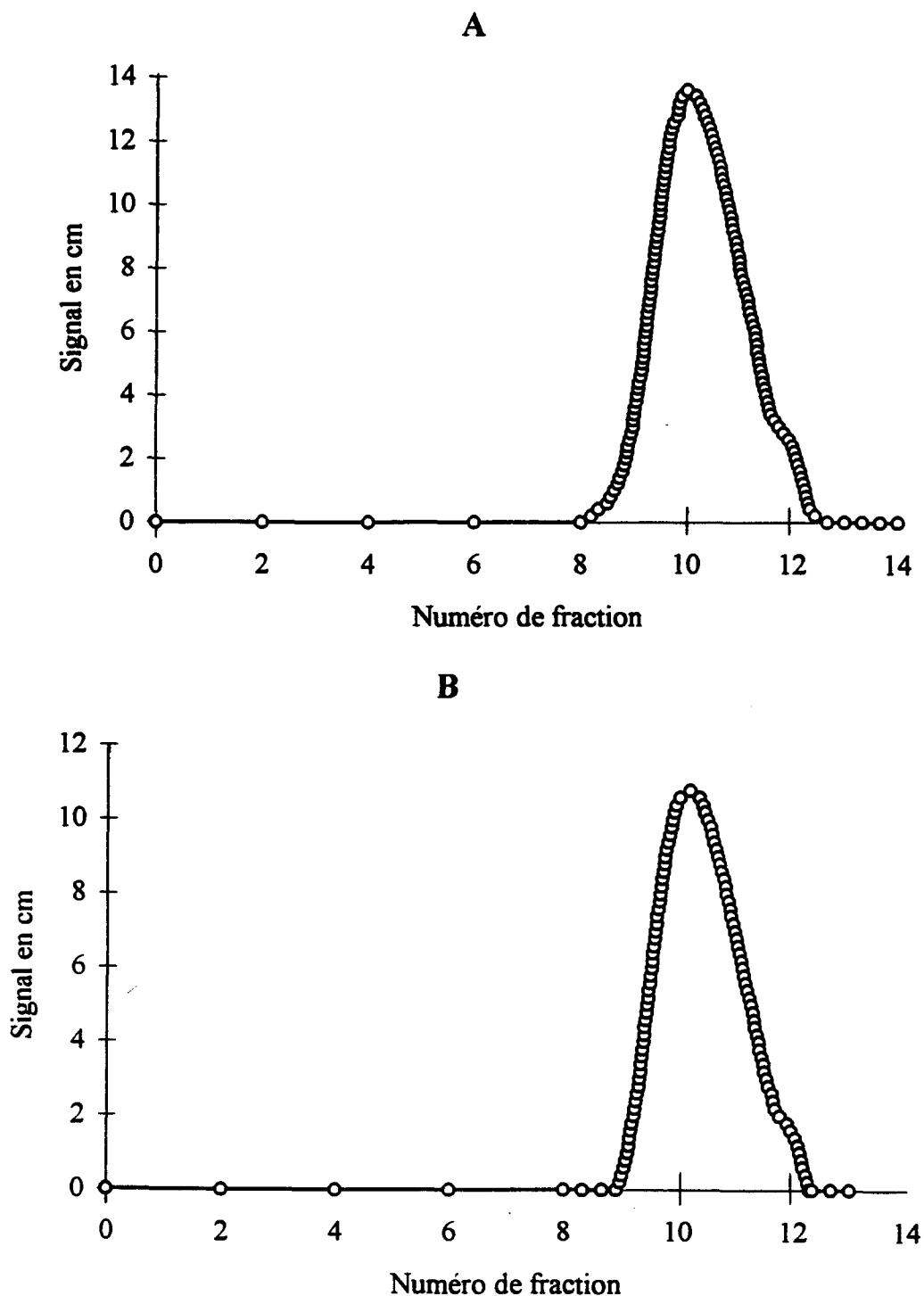


Figure 7. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 324 heures.

( A ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules sans cuivre.

( B ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules en présence de 250 ppb de cuivre.



### Après 516 heures

Le premier pic d'exclusion du profil d'élution des protéines extraites des cellules du ballon expérimental est assez étendu tandis qu'il est complètement absent pour le témoin (Figure 8). Le pic de la limite de perméation des protéines extraites des cellules du ballon expérimental présente une hauteur de signal légèrement plus élevée que le pic des protéines extraites des cellules du ballon témoin; les deux pics sont presque identiques et superposables.

### Après 732 heures

Le premier pic d'exclusion du profil d'élution des protéines extraites des cellules du ballon expérimental est assez étendu (Figure 9). Les pics de la limite de perméation sont identiques quoique celui des protéines extraites des cellules du ballon expérimental présente une hauteur de signal légèrement plus élevée que celui des cellules du ballon témoin.

### Discussion

Tous les chromatogrammes que nous avons obtenus se ressemblent et sont semblables à ceux présentés par Saint-Pierre (1993). Les pics d'exclusion des protéines extraites des cellules du ballon expérimental sont identiques et superposables à ceux des pics d'exclusion des protéines extraites du ballon témoin pour chaque échantillon. D'après nos résultats, les protéines extraites des cellules du ballon témoin et expérimental correspondent aux fractions 9 à 11. Selon notre courbe d'étalonnage de la colonne chromatographique, la fraction 10, ou plus exactement le temps 305 minutes, correspond à une masse moléculaire nominale de 570 Da. Cette masse moléculaire est relativement faible par rapport aux autres masses

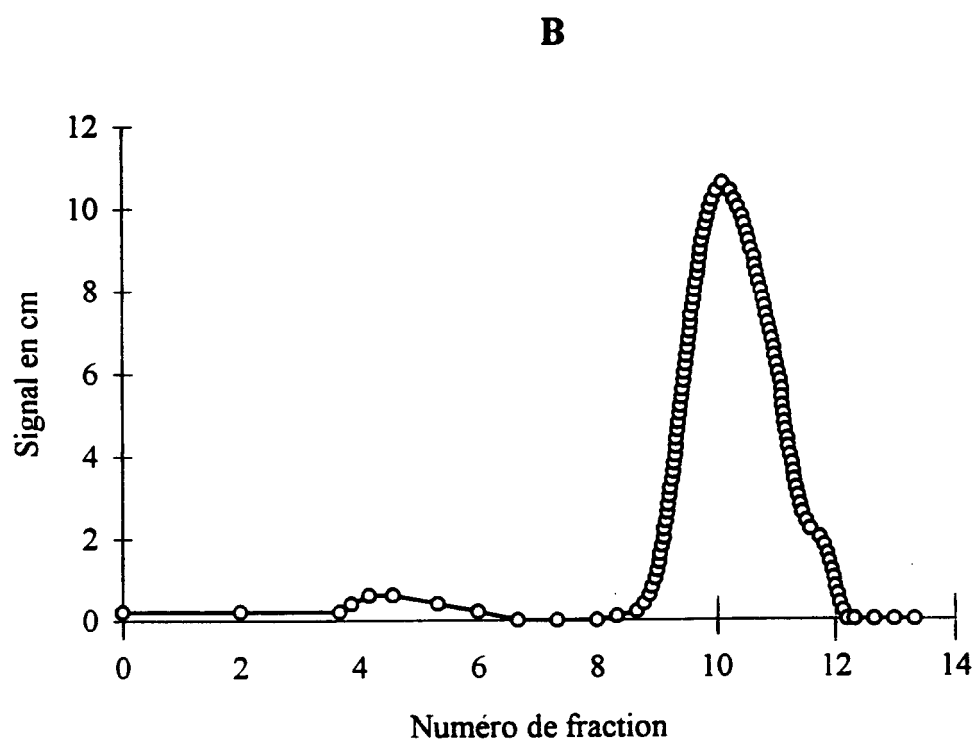
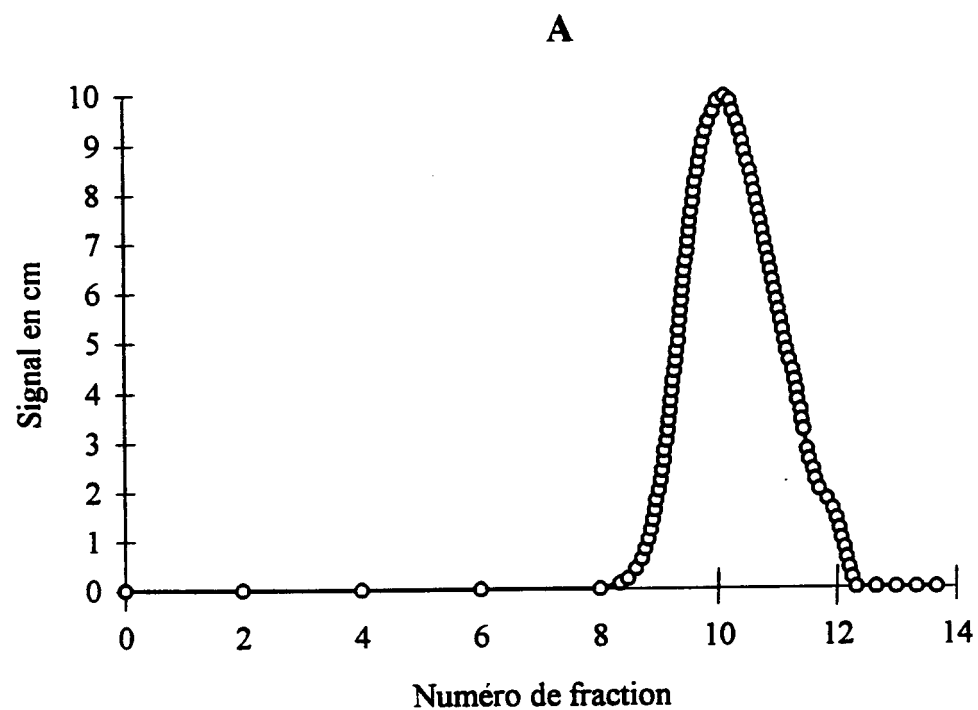


Figure 8. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 516 heures .

( A ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules sans cuivre.

( B ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules en présence de 250 ppb de cuivre.

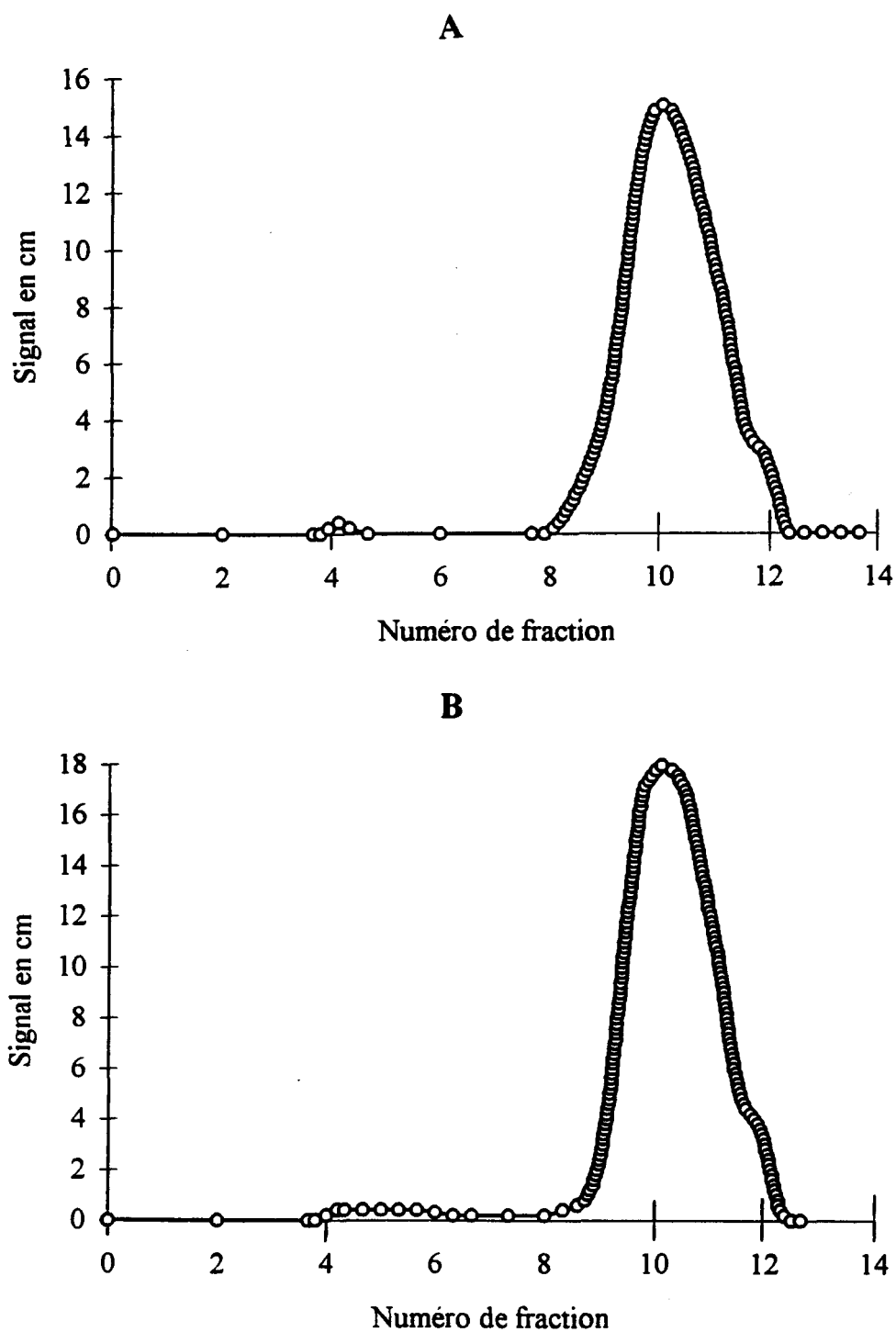


Figure 9. Profils d'élution des protéines extraites des cellules après 732 heures .

( A ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules sans cuivre.

( B ) Chromatogramme des protéines extraites des cellules en présence de 250 ppb de cuivre.

moléculaires des complexes phytochélatines extraites de différentes espèces d'algues marines. En effet, Reddy et Prasad (1991) ont observé, chez *S.quadricauda*, la masse moléculaire d'une protéine liant le cadmium à 3 800 Da. Pour sa part, Saint-Pierre (1993) avec les mêmes échantillons, a estimé que la masse moléculaire de la protéine se situait entre 800 et 2 100 Da.

### 3.2 Spectres d'absorbance

Avant de procéder à la prise des spectres infrarouges des protéines de cellules *S. quadricauda*, nous avons effectué plusieurs tests afin de déterminer la précision, l'intensité du bruit de fond et la reproductibilité des coordonnées du spectre infrarouge pour un échantillon donné. Pour déterminer la précision, nous avons effectué deux prises successives de spectres en simple faisceau de Tris-HCl à 0,01 M dans un intervalle de temps d'une heure (Figures 10 et 11). À l'aide du logiciel, nous avons déterminé les nombres d'ondes et les intensités de tous les points constituant chaque région spectrale d'intérêt de chacun des deux spectres. En analysant nos données, nous avons remarqué que les nombres d'ondes se reproduisent pour tous les points avec une précision de  $10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ , quelle que soit la nature de l'échantillon. Après avoir linéarisé la ligne de base le plus près possible de zéro, des faibles variations d'intensité pour les spectres à simple faisceau ont été enregistrées avec des écarts-types de  $8.10^{-8}$  autour d'une valeur moyenne de  $22.10^{-8}$  et de  $16.10^{-8}$  avec une moyenne de  $24.10^{-8}$  respectivement pour les 200 points de chacune des régions spectrales 1500-1600 et 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ . Deux spectres d'un même échantillon de protéines de cellules *S.quadricauda* ont été faits de la même manière que pour l'échantillon de Tris-HCl, dans un intervalle de temps de deux heures (Figures 12 et 13). Encore ici, nous avons remarqué que les nombres d'ondes des pics se reproduisent à  $10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ , pour les deux régions spectrales; par contre des faibles variations d'intensité sur les spectres à simple faisceau ont été enregistrées avec des écarts-types de  $6.10^{-8}$

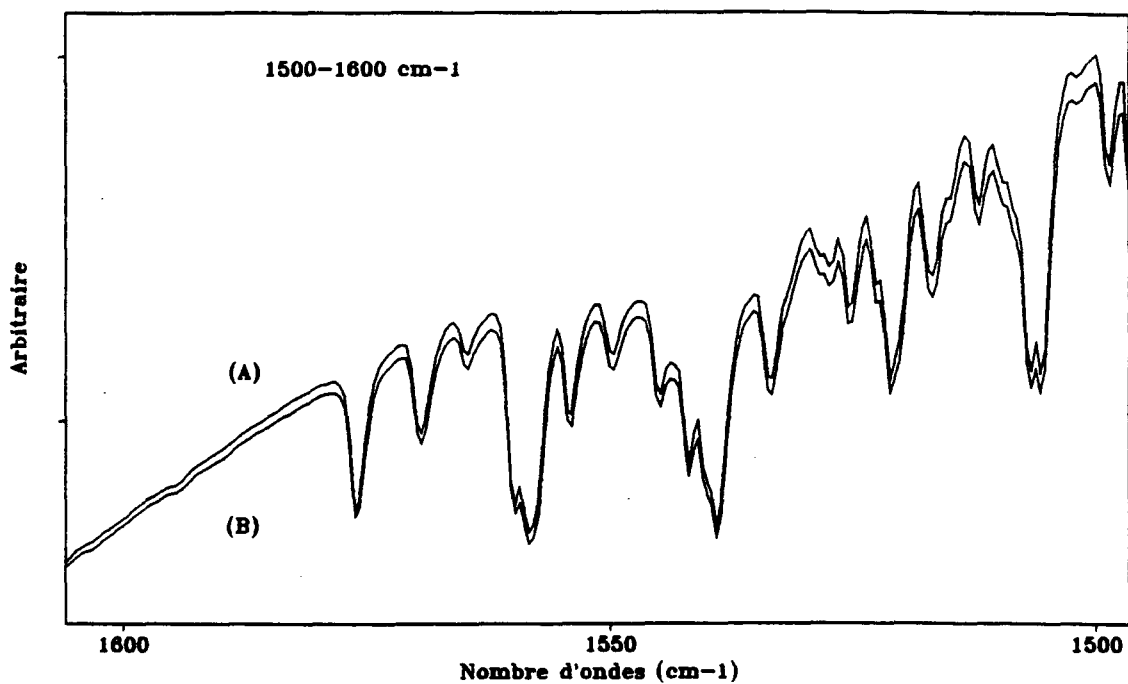


Figure 10. Spectres à simple faisceau du même échantillon de Tris-HCl: (A) pris à 19 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

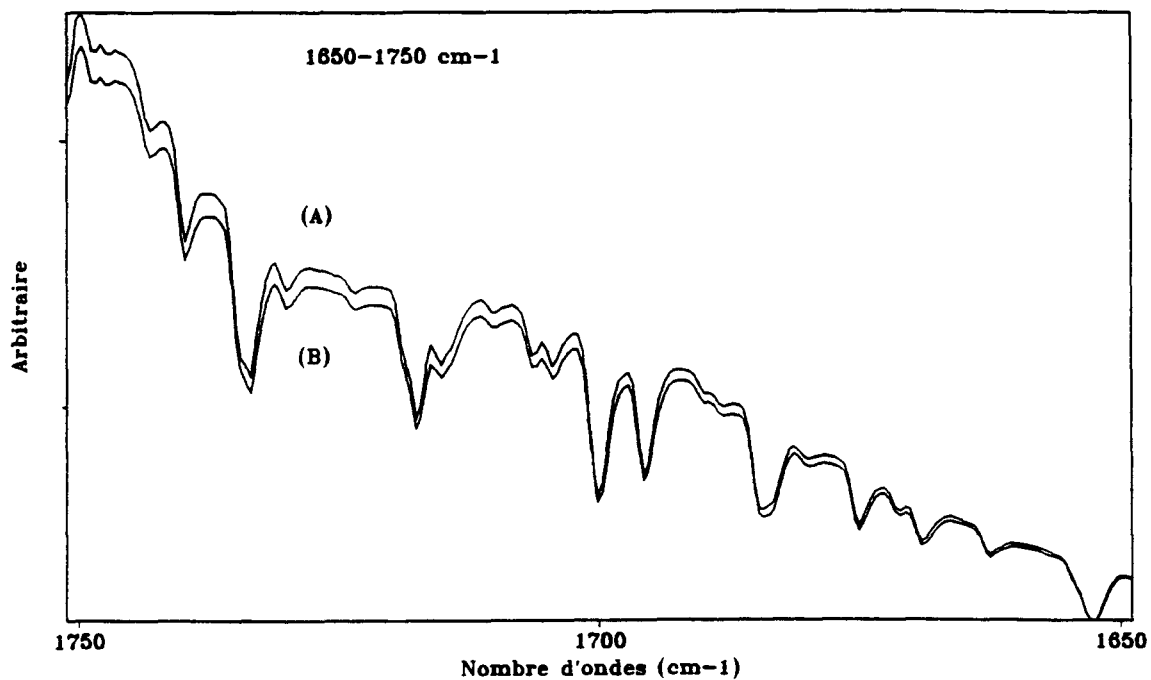


Figure 11. Spectres à simple faisceau du même échantillon de Tris-HCl: (A) pris à 19 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

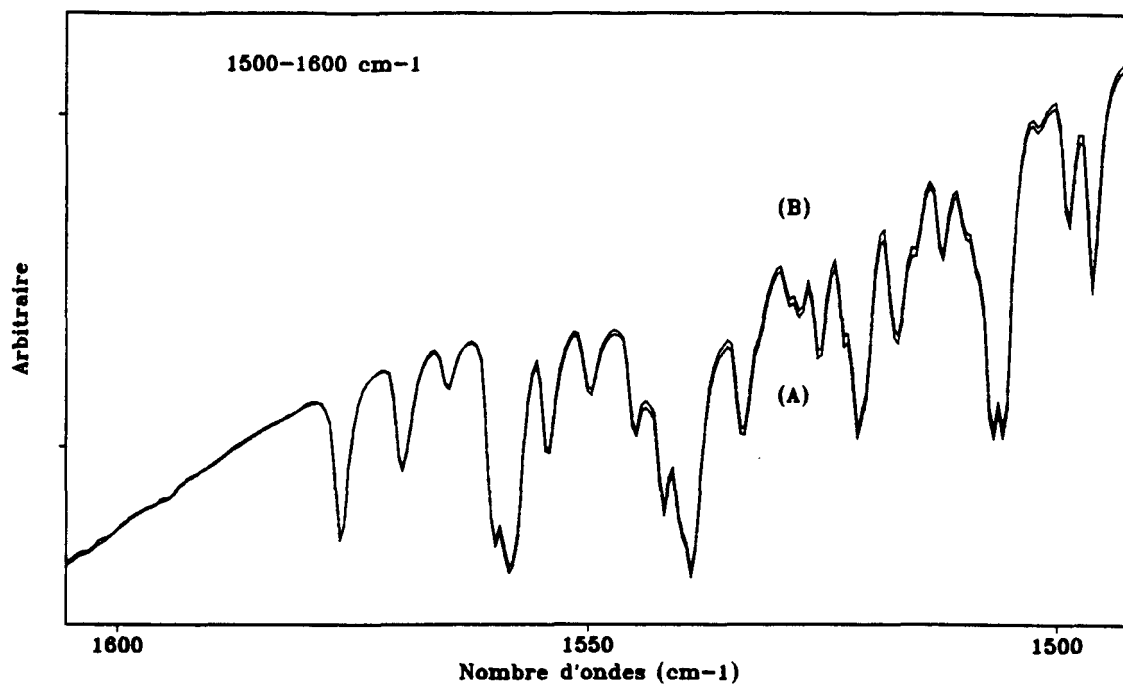


Figure 12. Spectres à simple faisceau du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ .

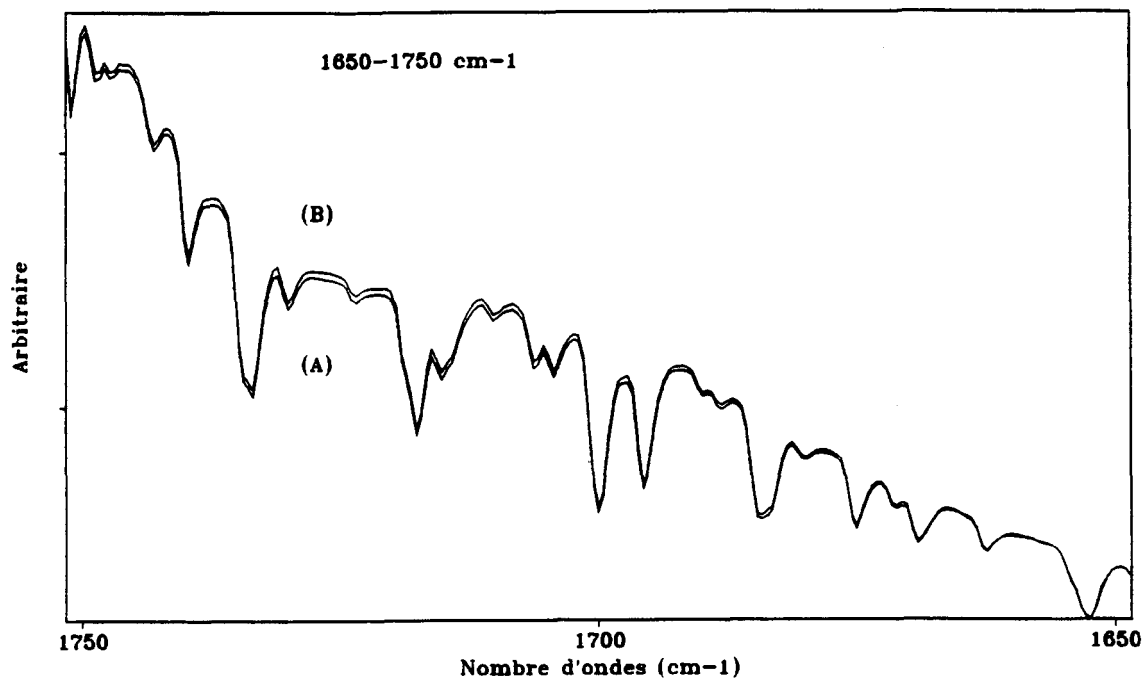


Figure 13. Spectres à simple faisceau du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région  $1650\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ .

autour d'une valeur moyenne de  $6.10^{-8}$  et de  $5.10^{-8}$  avec une valeur moyenne de  $9.10^{-8}$  respectivement pour les 200 points de chacune des régions spectrales 1500-1600 et 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

La précision des résultats fournis dépend aussi de l'intensité lumineuse qui atteint le détecteur. Nous prenons en considération deux causes d'erreur sur l'absorbance: le bruit de fond et les réflexions et diffusions lumineuses. Pour évaluer l'intensité du bruit de fond, nous avons décidé de calculer le spectre d'absorbance d'un échantillon de Tris-HCl par rapport à l'échantillon lui-même, pris une heure auparavant. Le spectre d'absorbance a présenté un léger bruit de fond. Nous avons alors étudié les quatre régions spectrales 800-900, 1500-1600, 1650-1750 et 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$  qui seront utiles pour l'analyse des spectres infrarouges de nos échantillons. Pour déterminer l'intensité du bruit de fond, nous avons calculé les écarts-types des 200 points pour chaque région spectrale après avoir linéarisé et normalisé à zéro la ligne de base. La région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$  a présenté un écart-type très faible  $\sigma = 0,0006$  en unité d'absorbance (u.a.) avec une moyenne de  $-0,0002$  u.a. par rapport à la ligne de base; les régions 800-900, 1500-1600 et 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$  ont présenté respectivement, des écarts-types de même ordre, soit 0,0022, 0,0029 et 0,0038 u.a. et des moyennes de 0,0007, de 0,0029 et de 0,0039 u.a. mais qui sont relativement faibles. À partir de ces résultats, nous avons eu recours à la loi normale centrée réduite qui nous permet de dire que 95 % des valeurs d'intensité se situant dans l'intervalle  $[-1,96\sigma, +1,96\sigma]$  correspondent au bruit de fond. Cette loi a été appliquée par rapport à la ligne de base pour chacune des bandes spectrales. Nous pouvons interpréter de telle manière qu'un pic ayant une intensité en dehors des intervalles  $[-0,0043, 0,0043]$ ,  $[-0,0057, 0,0057]$ ,  $[-0,0075, 0,0075]$  et  $[-0,0012, 0,0012]$  respectivement pour les bandes 800-900, 1500-1600, 1650-1750 et 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$  n'est pas du bruit de fond, tout en tenant compte du risque d'erreur de 5%.

Une autre caractéristique dont dépendent les résultats qualitatifs et quantitatifs est la répétabilité. En fait, certains auteurs nomment répétabilité la précision avec laquelle est reproduit un résultat par le même opérateur et avec le même appareil. Le contrôle de la répétabilité de l'appareil infrarouge a été fait à l'aide de deux spectres d'un même échantillon. Pour cela, nous avons pris deux spectres d'un même échantillon de protéines de cellules de *S.quadricauda* et un spectre de Tris-HCl qui a servi comme référence pour calculer les deux spectres d'absorbance. En observant ces deux derniers (Figures 14, 15, 16 et 17), nous remarquons qu'il y a une très faible variation d'intensité entre les deux spectres pour la bande 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$  et des variations un peu plus élevées pour les bandes 800-900, 1500-1600 et 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ ; cependant, nous pouvons considérer ces variations comme étant relativement faibles. Pour la précision des nombres d'ondes, nous avons eu une répétabilité de l'ordre de  $10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ , qui était donc négligeable à l'échelle de  $1 \text{ cm}^{-1}$  à laquelle nous voulons travailler. Les possibilités de contrôler la fidélité et la reproductibilité des intensités sont plus restreintes. C'est à l'aide du logiciel que nous avons déterminé les intensités de tous les points constituant chacune des quatre régions afin de calculer leurs écarts-types. La région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$  a présenté le plus faible écart-type  $\sigma = 0,0006 \text{ u.a.}$  avec une moyenne de  $0,0005 \text{ u.a.}$ ; après avoir linéarisé et normalisé à zéro la ligne de base du spectre, les régions 800-900, 1500-1600, 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$  ont présenté respectivement des écarts-types de même ordre tout en restant relativement faibles, soit  $0,0060$ ,  $0,0045$  et  $0,0070 \text{ u.a.}$  avec des moyennes de  $0,0042$ ,  $-0,0008$  et  $0,0018 \text{ u.a.}$  par rapport à la ligne de base. La loi normale centrée réduite nous a permis d'exprimer ces écarts-types d'une manière plus simple afin de les utiliser pour étudier nos spectres infrarouges des échantillons de protéines de cellules de *S.quadricauda*. A partir de cette loi normale, nous avons calculé pour chacune des régions spectrales 800-900, 1500-1600, 1650-1750 et 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ , les intervalles de confiance respectifs  $[-0,0011, 0,0011]$ ,  $[-0,0088, 0,0088]$ ,  $[-0,0130, 0,0130]$  et  $[-0,0012, 0,0012]$ . Chaque pic appartenant à une



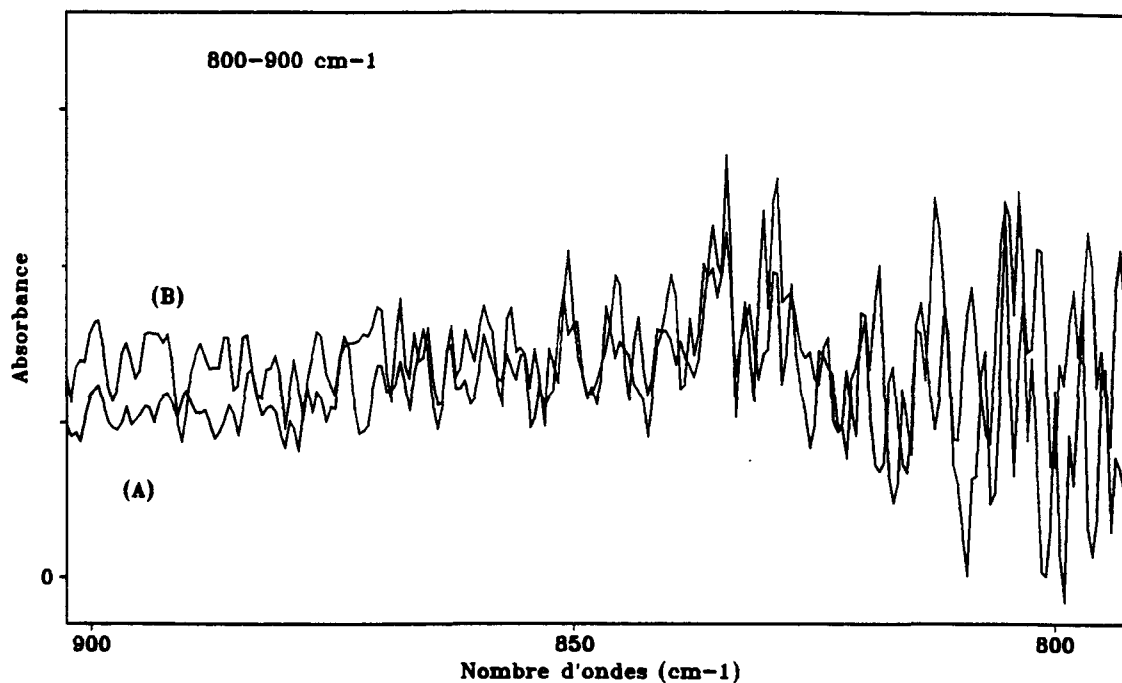


Figure 14. Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

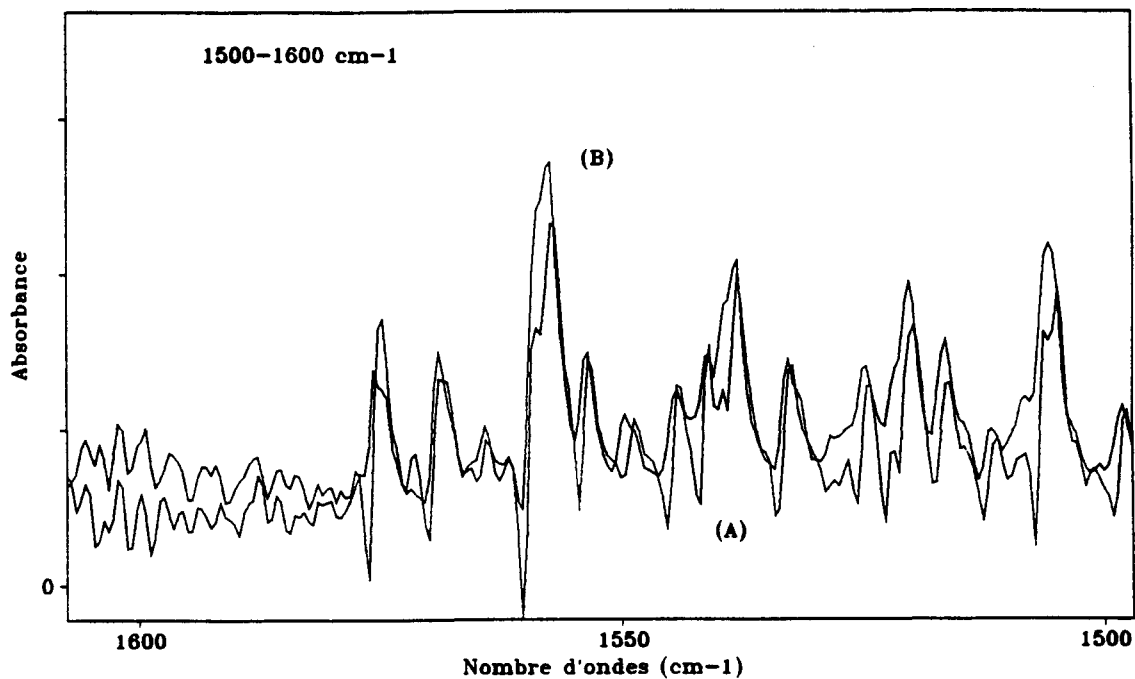


Figure 15. Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la bande 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

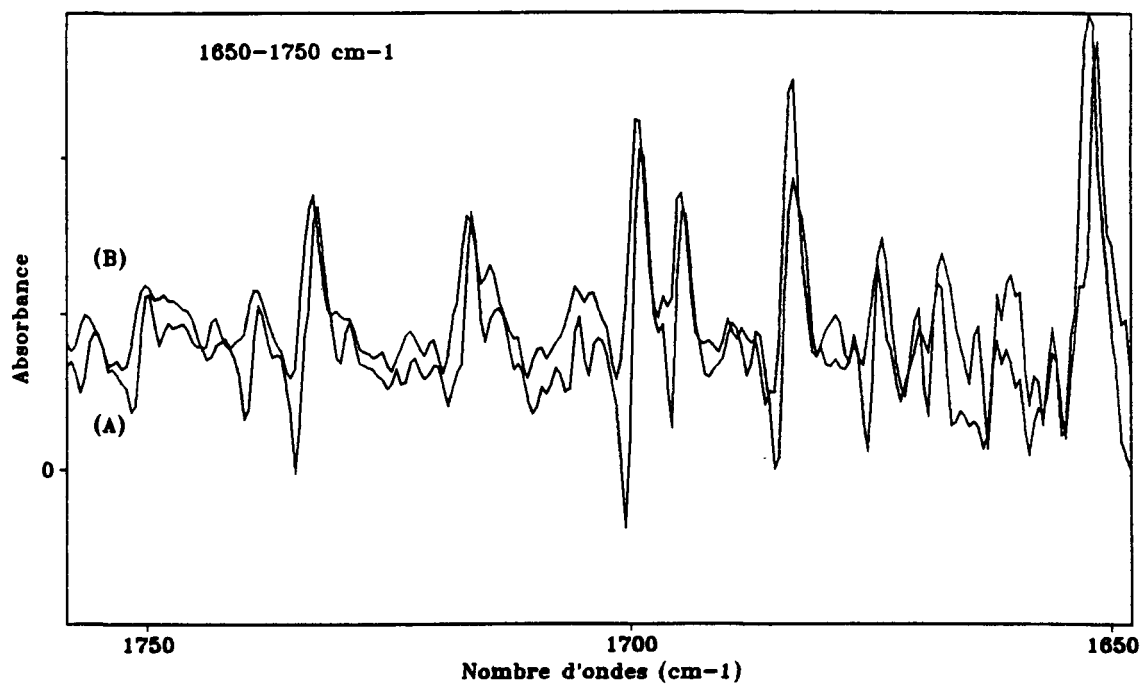


Figure 16. Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

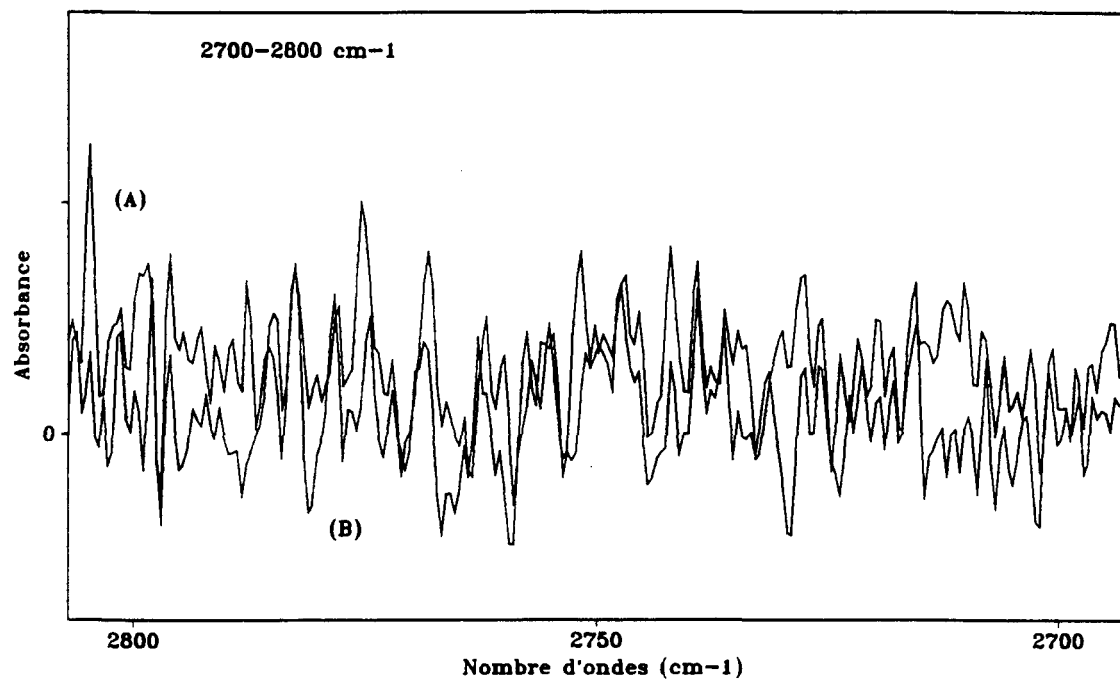


Figure 17. Spectres en absorbance du même échantillon de protéines: (A) pris à 18 heures; (B) pris à 20 heures le même jour pour la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

région spectrale donnée et ayant une différence d'intensité par rapport à la ligne de base dont la valeur est en dehors de son intervalle de confiance. La répétabilité, est considérée comme un pic avec un risque d'erreur seulement de 5%. À partir des résultats obtenus pour le bruit de fond et pour la répétabilité de l'appareil, nous remarquons que les intervalles de confiance du bruit de fond sont inclus dans les intervalles de confiance de la répétabilité pour chacune des régions spectrales. Nous avons alors décidé d'analyser nos spectres de protéines de cellules de *S.quadricauda* en se référant seulement aux intervalles de confiance de la répétabilité.

Pour étudier l'effet du cuivre sur certaines fonctions chimiques comme la fonction acide carboxylique, nous avons choisi l'acide oxalique qui est un diacide,  $\text{HOOC-COOH}$ . La figure 18 présente quatre spectres infrarouges de l'acide oxalique sans cuivre et de l'acide oxalique en présence de différentes doses de cuivre dans la région  $1000$  à  $2000\text{ cm}^{-1}$ . Nous remarquons que le pic situé aux alentours de  $1220\text{ cm}^{-1}$  se reproduit dans les quatre spectres. Ce pic peut correspondre aux vibrations caractéristiques du groupe  $\text{-COOH}$  (Avram et Mateescu, 1970). Les spectres présentent une certaine reproductibilité avec des légères variations en intensité et en nombres d'ondes dans certaines bandes spectrales. La figure 19 présente la région  $1610$ - $1660\text{ cm}^{-1}$  où nous avons noté l'absence de trois pics à  $1621$ ,  $1632$  et  $1634\text{ cm}^{-1}$  dans les spectres avec cuivre, avec exception pour celui à  $1632\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre de l'acide oxalique en présence de  $500\text{ ppb}$  de cuivre; un pic à  $1630\text{ cm}^{-1}$  est cependant à souligner dans les spectres de l'acide oxalique avec  $100\text{ ppb}$  et  $2\text{ ppm}$  de cuivre. Dans la région  $1640$ - $1680\text{ cm}^{-1}$ , nous avons enregistré dans les trois spectres de l'acide oxalique avec cuivre (Figure 20) l'absence du pic à  $1673\text{ cm}^{-1}$  qui peut être associé aux vibrations de la liaison  $\text{CO}$  (Avram et Mateescu, 1970). Nous pouvons supposer que la présence du cuivre a eu un effet sur l'acide oxalique et plus spécifiquement sur le groupe carboxylique. D'une façon générale, les acides organiques sont caractérisés par les vibrations du groupe carboxylique. Ce dernier possède six

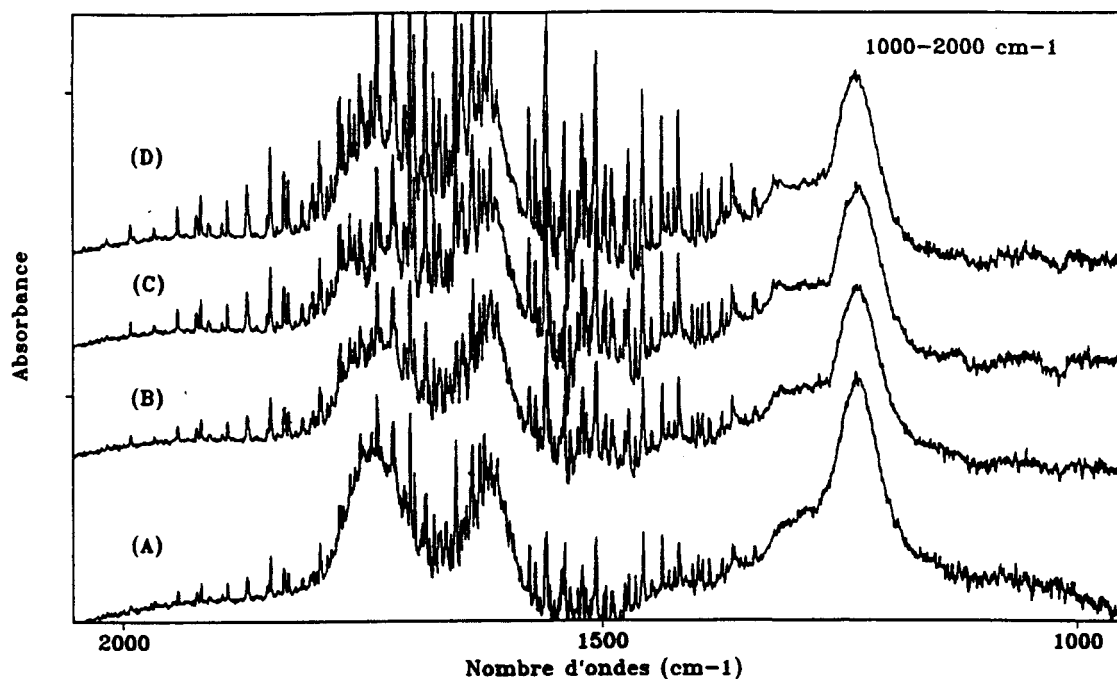


Figure 18. Spectres infrarouges de l'acide oxalique: (A) sans cuivre; (B) en présence de 100 ppb; (C) en présence de 500 ppb; (D) en présence de 2 ppm de cuivre pour la région 1000-2000  $\text{cm}^{-1}$ .

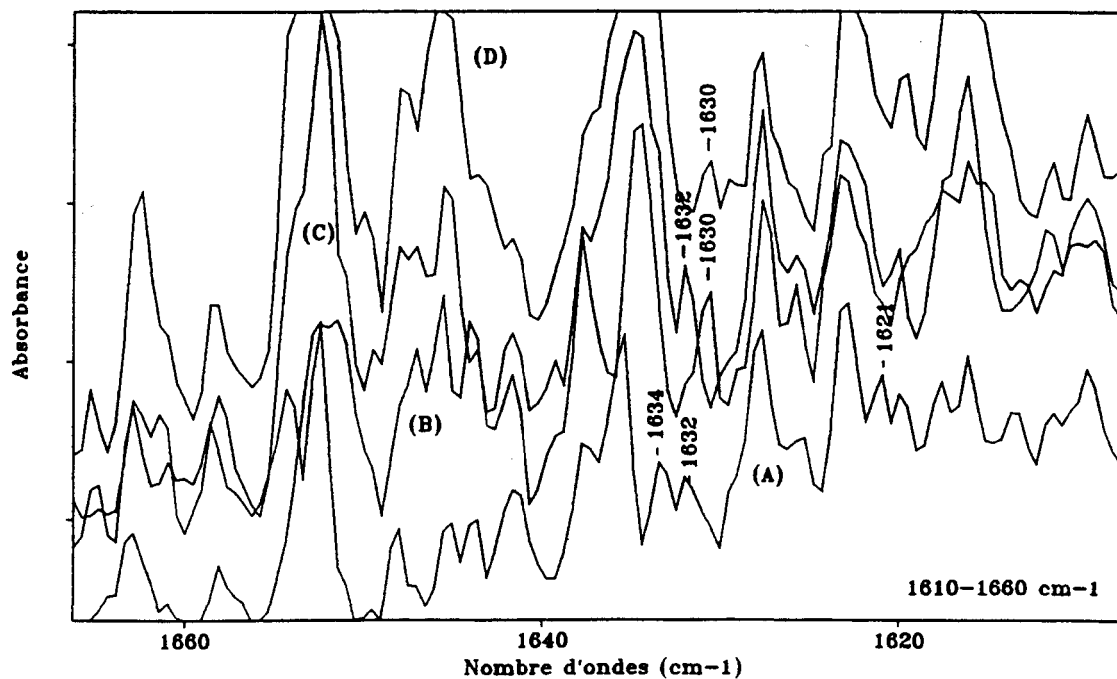


Figure 19. Spectres infrarouges de l'acide oxalique: (A) sans cuivre; (B) en présence de 100 ppb; (C) en présence de 500 ppb; (D) en présence de 2 ppm de cuivre pour la région 1610-1660  $\text{cm}^{-1}$ .

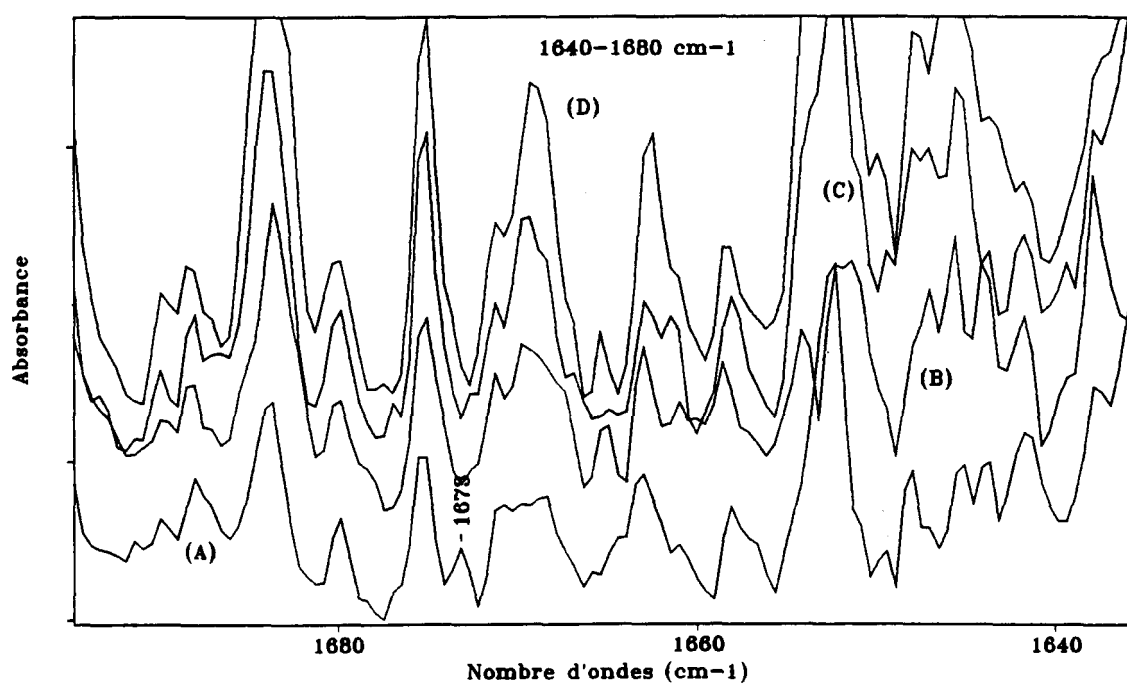


Figure 20. Spectres infrarouges de l'acide oxalique: (A) sans cuivre; (B) en présence de 100 ppb; (C) en présence de 500 ppb; (D) en présence de 2 ppm de cuivre pour la région 1640-1680 cm<sup>-1</sup>.

modes de vibration : trois vibrations de valence des liaisons OH, C=O et C-O; deux vibrations de déformation OH et une vibration de déformation caractéristique du groupe COOH (Avram et Mateescu, 1970). L'acide oxalique présente une absorption intense entre 1690 et 1710  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970) et la figure 18 le montre de façon claire. Dans la plupart des cas, la bande de la vibration C=O est généralement comprise entre 1650 et 1730  $\text{cm}^{-1}$ , dépendamment de la nature du solvant et de l'acide. Les variations observées dans les spectres qui pourraient être reliées à la présence du cuivre ont été enregistrées dans la bande 1610-1680  $\text{cm}^{-1}$ , ce qui laisse croire qu'il aurait pu y avoir une réaction d'interaction entre le cuivre et le groupe COOH par l'intermédiaire de la liaison C=O. D'après Russel (1965), la diminution du nombres d'ondes du groupe carboxyle complexé au cuivre est interprétée par la coordination de l'oxygène avec le cuivre dans le complexe lui-même. De même, Brischwein et *al.* (1993) ont appuyé l'hypothèse de Russel en étudiant le comportement de la vibration du groupe carboxylique et plus précisément la liaison C=O envers le cuivre en diminuant le pH de la solution. Ces chercheurs ont conclu que l'ion cuivrique a interagi avec le groupe CO à partir de l'oxygène à l'intérieur du site de la protéine même:



Plusieurs études et expériences ont été effectuées visant à mettre en évidence la synthèse des protéines complexantes avec le métal. Les protéines complexantes ou phytochélatines sont principalement composées par la glutamine, la cystéine et la glycine (Reddy et Prasad, 1991). Grill et *al.* (1988) ont montré que les phytochélatines sont formées par des chaînes peptidiques représentées par  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  avec  $n = 2$  à 5 chez l'algue *Chlorella Fusca*. Reddy et Prasad (1991) ont confirmé la présence de la cystéine dans la protéine par la liaison SH-Cd chez *S.quadricauda* exposée au cadmium. Une étude sur les levures *Schizosaccharomyces pombe* exposées au cadmium a montré que le composé  $\gamma$ -glutamylcystéine est lié par la liaison

cadmium-thiol (Plocke et Kägi, 1992). Ce phénomène s'explique par le fait que la coordination avec le métal est souvent due à l'atome de soufre issu de la structure régulière tétraédrique  $\text{CdS}_4$  (Plocke et Kägi, 1992). Il serait donc possible de supposer que les protéines extraites de nos cellules de *S. quadricauda* soient composées par des acides aminés comme la cystéine, la glutamine et la glycine.

D'autres chercheurs ont poussé leurs études plus loin en impliquant le glutathion comme substrat dans la formation des phytochélatines. Le glutathion est un tripeptide de composition brute  $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine représenté par G-SH; très bon réducteur, il réagit préférentiellement avec les oxydants doux en présence de  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ . En effet, Harmens et al. (1993) ont montré le rôle que joue le glutathion dans les phytochélatines pour augmenter la tolérance des racines de *Silene vulgaris* envers le zinc. Il a été récemment démontré que la formation des phytochélatines est catalysée par la  $\gamma$ -glutamylcystéine dipeptidyle transpeptidase activée en présence d'ions métalliques et que le glutathion-SH était présent comme substrat (De Vos et al., 1992). Ce rôle a été interprété de différentes façons: Tukendorf et Rauser (1990) rapportent que le cuivre cause l'augmentation du taux de glutathion dans les racines de maïs; De Vos et al. (1992) ont montré que le cuivre présent dans les phytochélatines sous forme de  $\text{Cu}^{2+}$  est lié avec le groupe thiol, le cuivre jouant le rôle de catalyseur non seulement dans l'oxydation du glutathion mais aussi pour d'autres composés à groupe thiol. La plupart des études ont mis en évidence l'importance du groupe thiol et le rôle qu'il joue dans la complexation de la protéine par le métal mais rien ne confirme qu'il est le seul groupe dans la protéine capable de se lier à un métal. L'étude effectuée par Hildebrandt et al. (1994) sur l'halocyanine, une protéine isolée de *Natronobacterium phraonis* contenant du cuivre dans sa structure, a montré que le cuivre est attaché par deux histidines et une cystéine. Auparavant Sykes (1991) est arrivé à la même conclusion tout en confirmant que les

liaisons Cu-cystéine et Cu-histidine sont identiques du point de vue longueur et angles. D'autre part, Nestor et *al.*(1984) ainsi que Woodruff et *al.*(1984) ont montré que le cuivre s'est lié à l'histidine grâce à la liaison N-H ayant comme structure Cu-N-histidine. À la suite des études citées antérieurement sur l'interaction métal-phytochélatines, nous ne pouvons associer l'interaction Cu-protéine juste au groupe thiol mais aussi aux groupes amides des acides aminés.

En effet, la complexité de la structure des protéines se manifeste dans le spectre infrarouge par la présence de larges bandes intenses et non différenciées. Cela est dû à la diversité des acides aminés qui entrent dans la composition des protéines. La superposition partielle ou totale des bandes assez larges des protéines aide à nous indiquer les régions caractéristiques à étudier des vibrations des groupes peptidiques -NH-CO-, cette étude peut mener des contributions importantes pour élucider certains problèmes de structure et de complexation. Parmi les bandes caractéristiques de la liaison peptidique -NH-CO-, nous retrouvons la vibration NH dans la bande 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963; Russel, 1965; Avram et Mateescu, 1970), la vibration  $\text{NH}_2^+$  dans les deux bandes 1550-1620  $\text{cm}^{-1}$  et 2650-2800  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963), la vibration  $\text{NH}_3^+$  dans la bande 1550-1650  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963; Avram et Mateescu, 1970) et la vibration du groupe CO dans la bande 1400-1700  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970). Vu la complexité de la structure de nos protéines, ces dernières peuvent être constituées de certains résidus d'acides aminés qui présentent une vibration dans la bande 850-900  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963). Ainsi, Russel (1965) a démontré que les liaisons  $\text{NH}_2$  et  $\text{NH}_3$  peuvent complexer avec les métaux en donnant les complexes M- $\text{NH}_2$ , dont leurs vibrations sont comprises entre 1500-1580  $\text{cm}^{-1}$  et entre 700-850  $\text{cm}^{-1}$  et les complexes M- $\text{NH}_3$ , dont leurs vibrations sont comprises entre 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  et entre 700-950  $\text{cm}^{-1}$ . Il faut mentionner que les groupes thiols ont une fréquence de vibration entre 2450 et 2650  $\text{cm}^{-1}$



(Rao, 1963; Avram et Mateescu, 1970); cette région a présenté des intensités très faibles sur tous les spectres et les pics n'étant vraiment pas visibles et sont confondus avec le bruit de fond. En effet, l'intensité de l'absorption de la liaison SH n'est pas très importante et dans le cas des acides aminés, la bande associée à la liaison SH, va être couverte par les fortes absorptions des groupes carboxyles COOH (Avram et Mateescu, 1970). À partir de ces données et contraintes, nous avons étudié nos spectres infrarouges dans les quatre régions spectrales suivantes :  $800-900\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650-1750\text{ cm}^{-1}$  et  $2700-2800\text{ cm}^{-1}$ .

Notre travail consiste donc à comparer les spectres infrarouges des protéines de cellules de *S. quadricauda* avec et sans cuivre pour chaque région spectrale de chaque échantillon. Nous notons tous les pics disparus qui avaient une intensité supérieure à celle de la répétabilité de l'appareil, ceux-ci étant marqués sur les spectres des échantillons témoins. Les critères de sélection seront les mêmes pour les nouveaux pics mais ils seront marqués sur les spectres des échantillons expérimentaux. Il faut mentionner qu'une marge d'erreur de plus ou moins  $4\text{ cm}^{-1}$  a été retenue pour les nombres d'ondes des nouveaux pics et des pics disparus pour regrouper ces pics et considérer qu'ils se sont reproduits d'un échantillon à un autre. Cette marge d'erreur est prise en considération suite à plusieurs facteurs comme celui du solvant utilisé qui agit sur la position, la forme et l'intensité des bandes d'absorbance (Jackson et Mantsch, 1995). En fait, l'état liquide est pratiquement la technique la plus adéquate pour l'analyse en spectroscopie infrarouge dans le cas des protéines dissoutes où les résultats obtenus sont très reproductibles (Avram et Mateescu, 1970).

### 3.2.1 Spectres infrarouges pour la région $800-900\text{ cm}^{-1}$

Les six spectres des échantillons témoins de protéines de cellules *S. quadricauda* ont

presque la même allure (Figures 21A, 22A, 23A, 24A, 25A et 26A). Nous remarquons que les pics au voisinage de  $800\text{ cm}^{-1}$  ont une intensité assez élevée par rapport aux autres pics. Il en est de même pour les spectres des échantillons expérimentaux de protéines de cellules *S.quadricauda* (Figures 21B, 22B, 23B, 24B, 25B et 26B). Après avoir analysé nos spectres infrarouges, nous avons remarqué l'absence de certains pics et la présence de nouveaux pics dans presque tous les spectres des échantillons de protéines avec cuivre. Les pics notés comme absents dans le spectre de l'échantillon expérimental sont marqués sur le spectre de l'échantillon témoin pour pouvoir mieux le situer visuellement. De même, nous appellerons une série de pics, les pics qui se sont reproduits au minimum dans trois spectres sur six. Il faut mentionner que les deux spectres de l'échantillon après 516 heures avec et sans cuivre n'ont présenté aucune différence de pics mais plutôt une variation d'intensité de certains pics observés surtout dans la région  $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ . Tous les pics disparus et les nouveaux pics ont été énumérés respectivement dans les tableaux I et II.

Nous remarquons dans le tableau I que le pic disparu à  $828\text{ cm}^{-1}$  du spectre de l'échantillon témoin après 156 heures (Figure 23A) est regroupé sur la même ligne avec les pics à  $830$  et  $832\text{ cm}^{-1}$  dans les spectres de l'échantillon témoin après 324 heures (Figure 24A) et après 732 heures (Figure 26A). D'autres pics disparus à  $842$  et  $843\text{ cm}^{-1}$  ont été enregistrés respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin de protéines après 84 heures (Figure 22A) et après 732 heures (Figure 26A). Il en est de même pour les pics à  $869$  et  $877\text{ cm}^{-1}$  qui ont été notés respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 12 heures (Figure 21A) et après 732 heures (Figure 26A). Ces deux derniers pics n'ont été observés qu'une fois et peuvent correspondre à des déformations d'acides aminés (Rao, 1963). Les pics disparus à  $828$ ,  $830$  et  $832\text{ cm}^{-1}$  peuvent correspondre aux vibrations de la liaison  $\text{-CH}_2$  de la chaîne peptidique qui présente une bande d'absorbance entre  $800$  et  $850\text{ cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu,

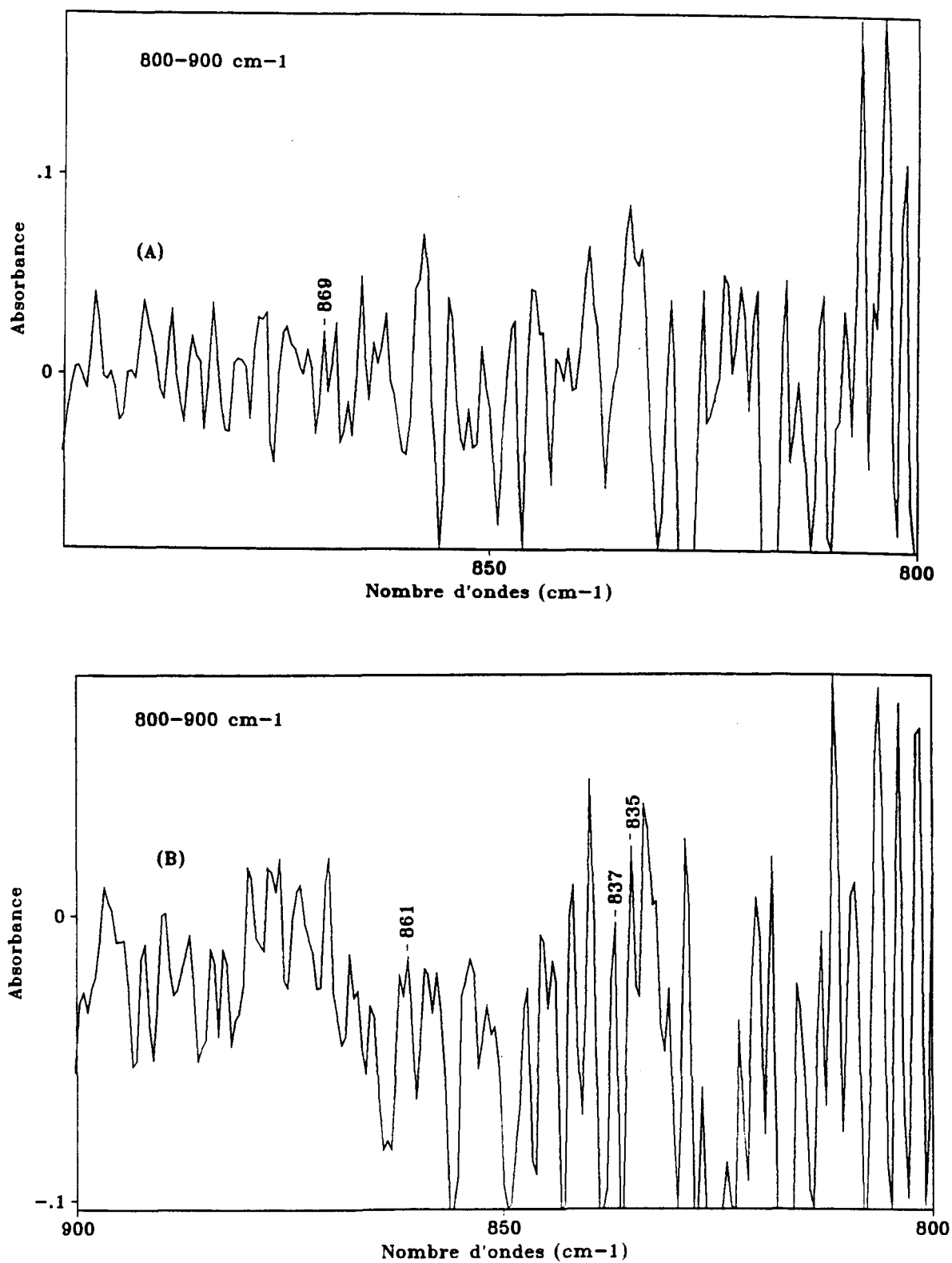


Figure 21. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

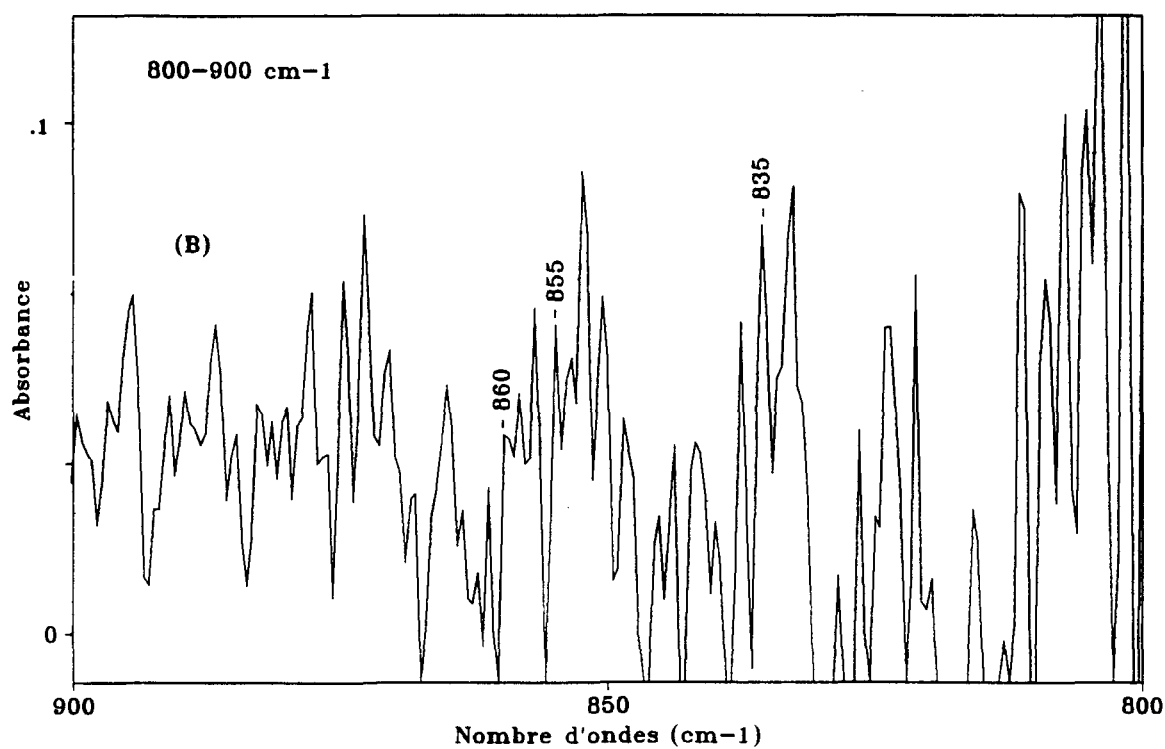
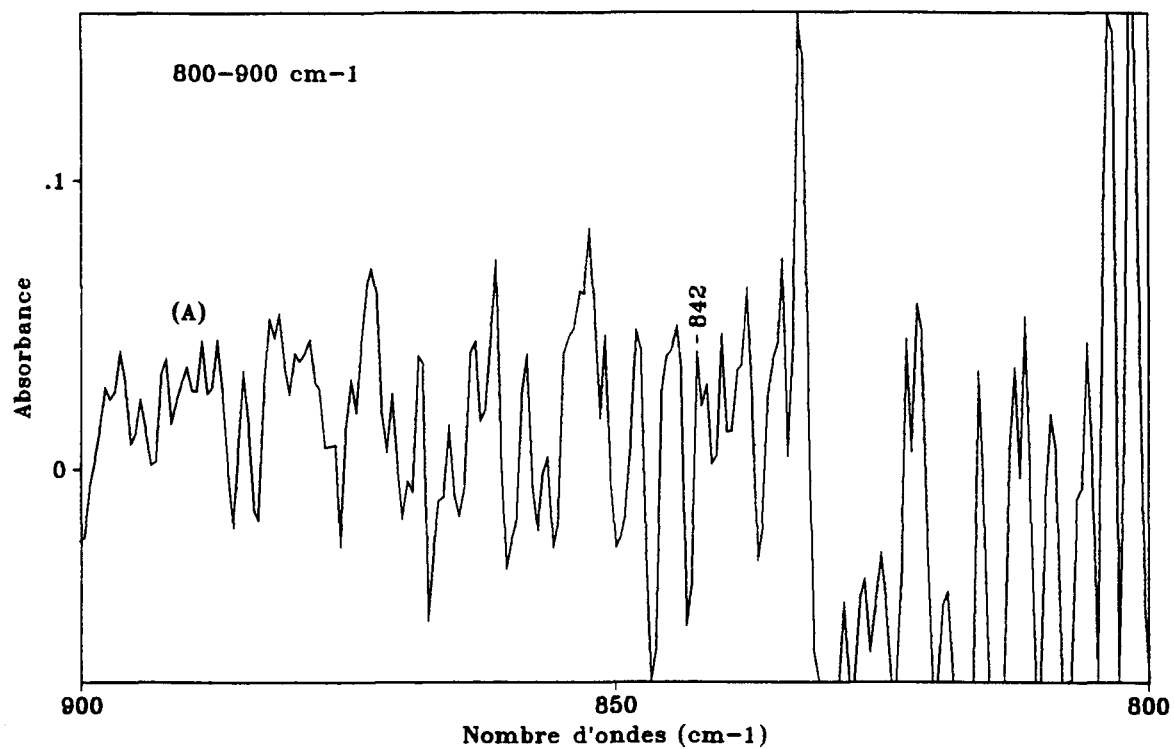


Figure 22. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

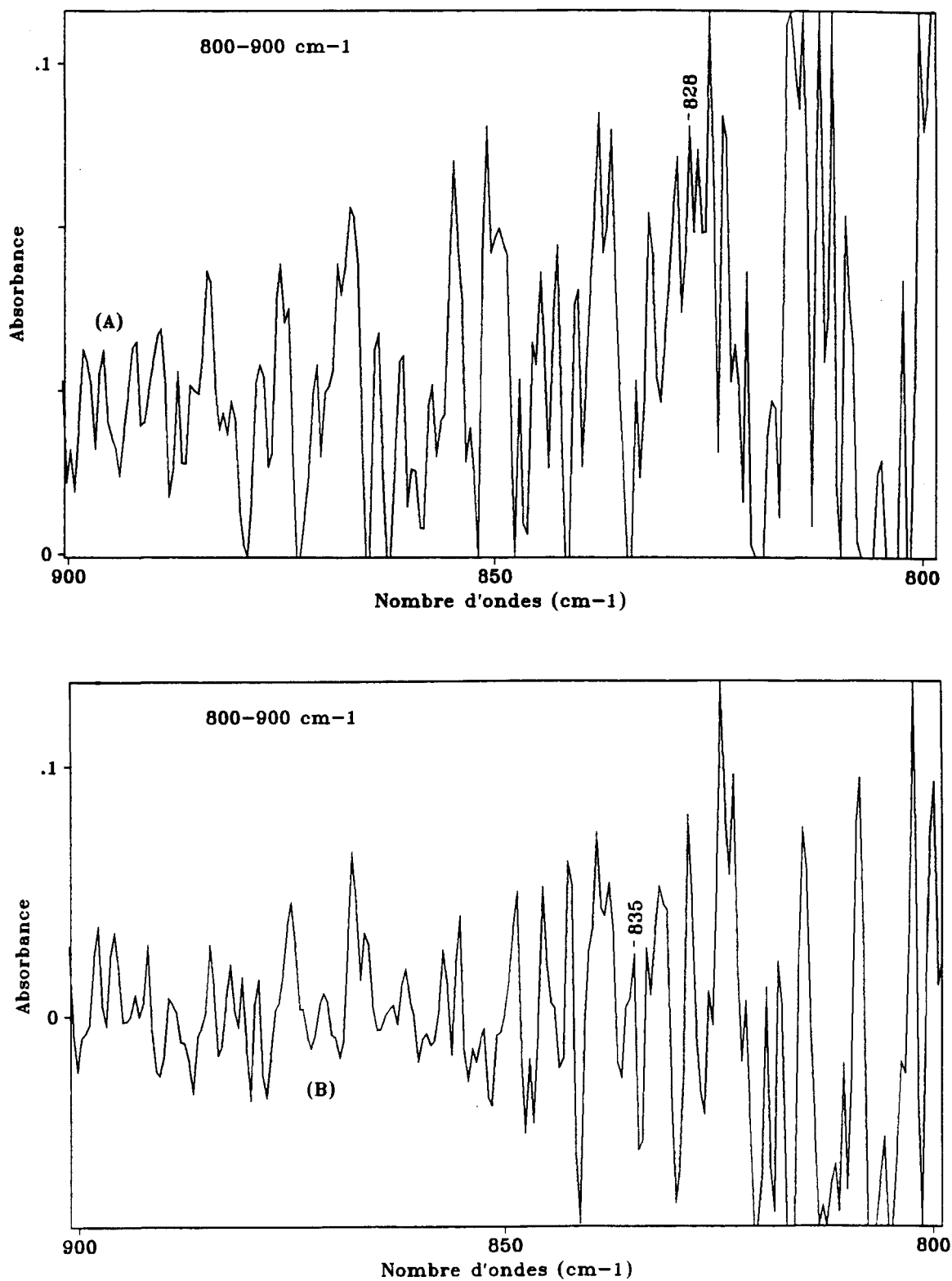


Figure 23. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

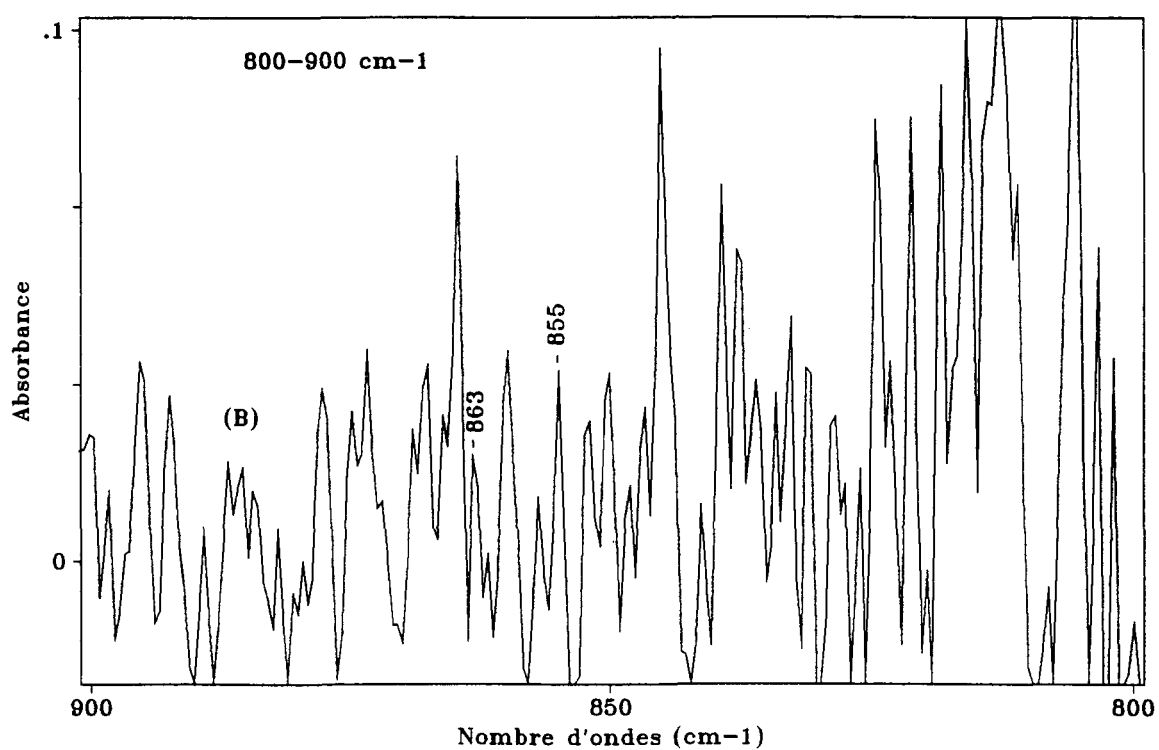
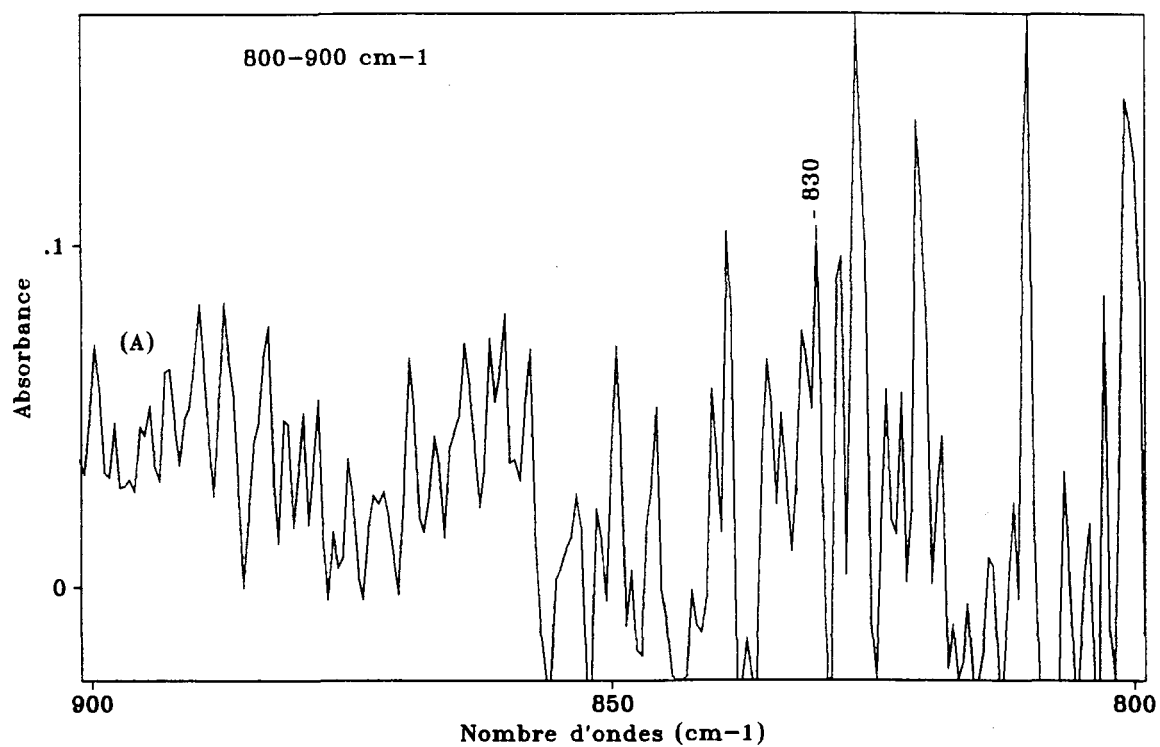


Figure 24. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

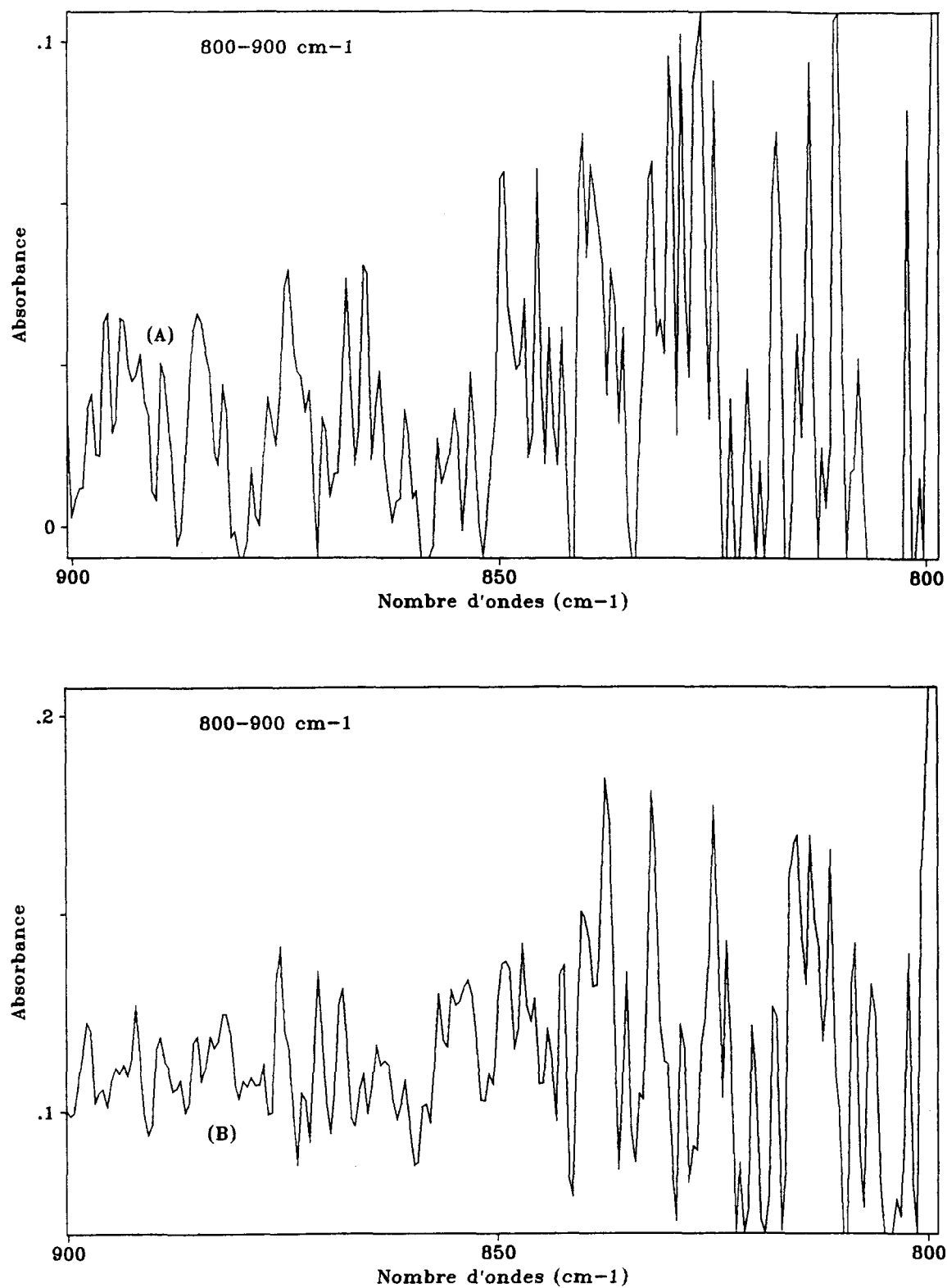


Figure 25. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

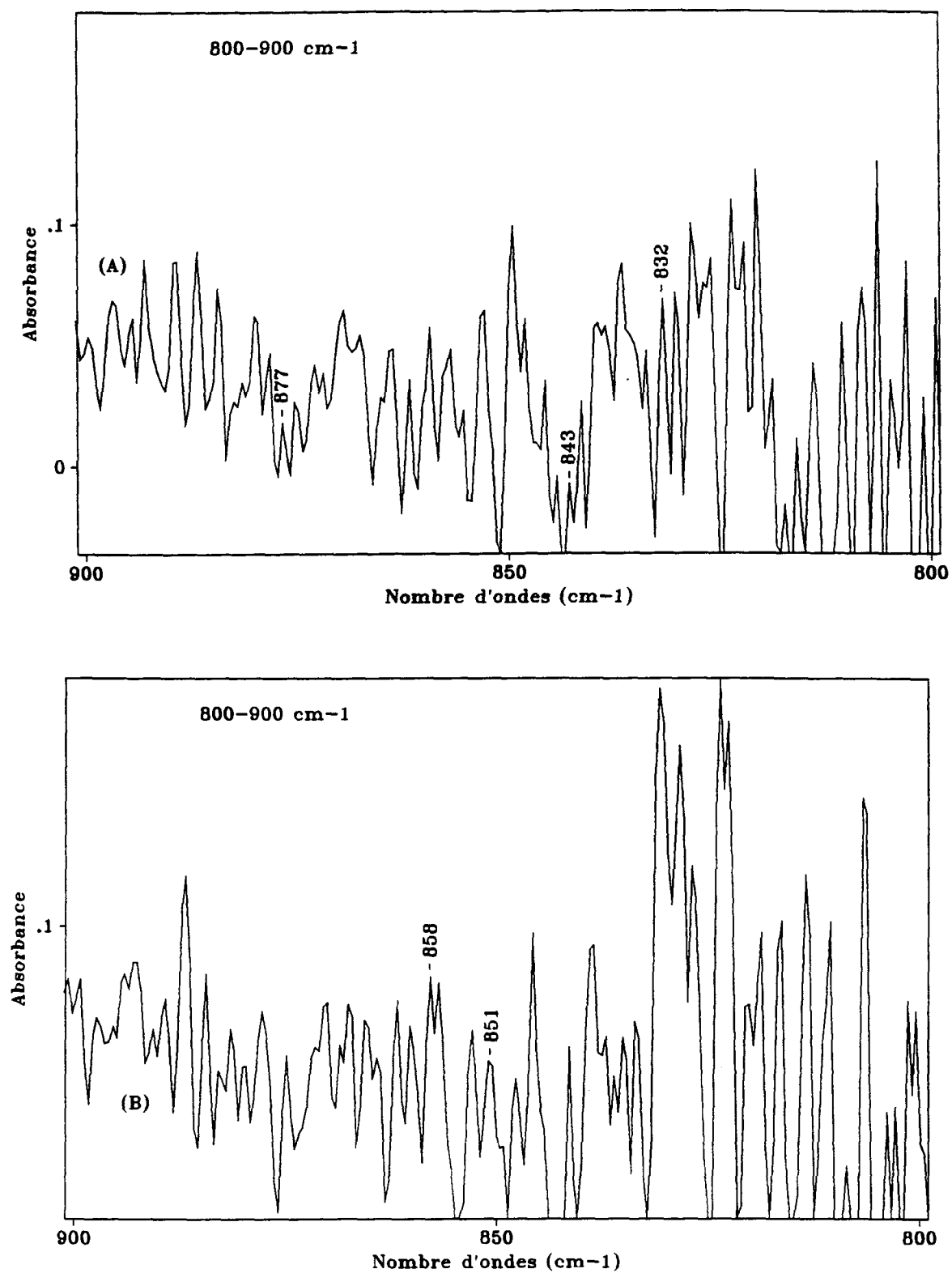


Figure 26. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .



Tableau I. Pics disparus pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a
				828	0,018	830	0,053			832	0,044
		842	0,023							843	0,02
869	0,03									877	0,019

Tableau II. Nouveaux pics pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a
835	0,046	835	0,039	835	0,023						
837	0,055										
		855	0,025			855	0,037			851	0,016
861	0,018	860	0,016			863	0,016			858	0,017

1970). Il est possible que la présence du cuivre ait provoqué une certaine perturbation dans la structure de la protéine, ce qui a amené le déplacement de ces vibrations.

A ce propos, Rao (1963) a montré que le métal peut provoquer un déplacement de la vibration d'une liaison jusqu'à  $100\text{ cm}^{-1}$ . D'autre part, le tableau II présente des résultats très intéressants où nous avons enregistré trois séries de nouveaux pics: le pic à  $835\text{ cm}^{-1}$  qui s'est reproduit dans les spectres de l'échantillon expérimental de protéines de cellules *S.quadricauda* après 12 heures (Figure 21B), après 84 heures (Figure 22B) et après 156 heures (Figure 23B); les pics à  $851$ ,  $855$  et  $855\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental de protéines de cellules de *S.quadricauda* après 732 heures (Figure 22B), après 84 heures (Figure 24B) et après 324 heures (Figure 26B); enfin, la dernière série de pics à  $858$ ,  $860$ ,  $861$  et  $863\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental de protéines de cellules de *S.quadricauda* après 732 heures (Figure 26B), après 84 heures (Figure 22B), après 12 heures (Figure 21B) et après 324 heures (Figure 24B).

Les pics à  $835\text{ cm}^{-1}$  présentent une intensité assez élevée par rapport aux autres nouveaux pics. De même, le pic à  $837\text{ cm}^{-1}$  enregistré dans le spectre de l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 21B) a présenté l'intensité la plus élevée, soit  $0,055\text{ u.a.}$ , dans l'ensemble des intensités des nouveaux pics. Nous supposons alors, que ces pics peuvent correspondre aux vibrations des groupes méthylènes  $-\text{CH}_2$  de la chaîne peptidique (Avram et Mateescu, 1970) qui se caractérisent par une bande d'absorbance assez intense entre  $800$  et  $850\text{ cm}^{-1}$  et peuvent masquer les vibrations de la liaison N-H comprises dans cette bande. Les deux autres séries de pics compris entre  $851$  et  $855\text{ cm}^{-1}$  et entre  $858$  et  $863\text{ cm}^{-1}$  peuvent correspondre aux vibrations de la liaison N-H du groupe  $\text{NH}_2$  qui présente une bande

d'absorbance comprise entre 850 et 900  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970). Russel (1965) a montré que les vibrations de la liaison N-H dans le complexe métal- $\text{NH}_2$  sont comprises dans cette bande. En effet, Solomon et *al.* (1992) ont suggéré un mécanisme de transition d'électrons où l'azote dans une protéine, aurait tendance à réagir avec les ions de cuivre par l'intermédiaire de la liaison N-H. Quoiqu'il en soit, l'absence ou l'existence des pics mettent en évidence l'interaction cuivre-protéine, principalement par l'intermédiaire du groupe  $\text{NH}_2$  pour la bande 800-900  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.2 Spectres infrarouges pour la région 1500-1600 $\text{cm}^{-1}$

La région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la bande amide II. En fait, Remsen et Freeman (1991) ont situé cette bande entre 1450 et 1550  $\text{cm}^{-1}$  tandis que Jakobsen et Wasacz (1990) l'ont plutôt spécifiée et ont montré qu'il s'agit de la région entre 1515 et 1575  $\text{cm}^{-1}$ . La plupart des études effectuées sur la structure des protéines ont montré que la bande amide II est incluse dans la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963; Avram et Mateescu, 1970; Solomon et *al.*, 1992; Brischwein et *al.*, 1993).

Tous les spectres des échantillons témoins et expérimentaux de protéines de cellules *S. quadricauda* (Figures 27, 28, 29, 30, 31 et 32) ont présenté une allure assez similaire pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  à l'exception du spectre de l'échantillon témoin après 156 heures (Figure 29A) qui a présenté une ligne de base un peu oblique. Nous remarquons sur tous les spectres que l'intensité de plusieurs pics est assez élevée dans la région 1550-1600  $\text{cm}^{-1}$ . Nous pensons que cela est dû à la forte bande d'absorbance de l'eau comprise entre 1610-1640  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963). Après avoir analysé nos spectres, nous avons remarqué la présence de nouveaux pics dans tous les spectres des échantillons expérimentaux et des pics disparus sont notés dans

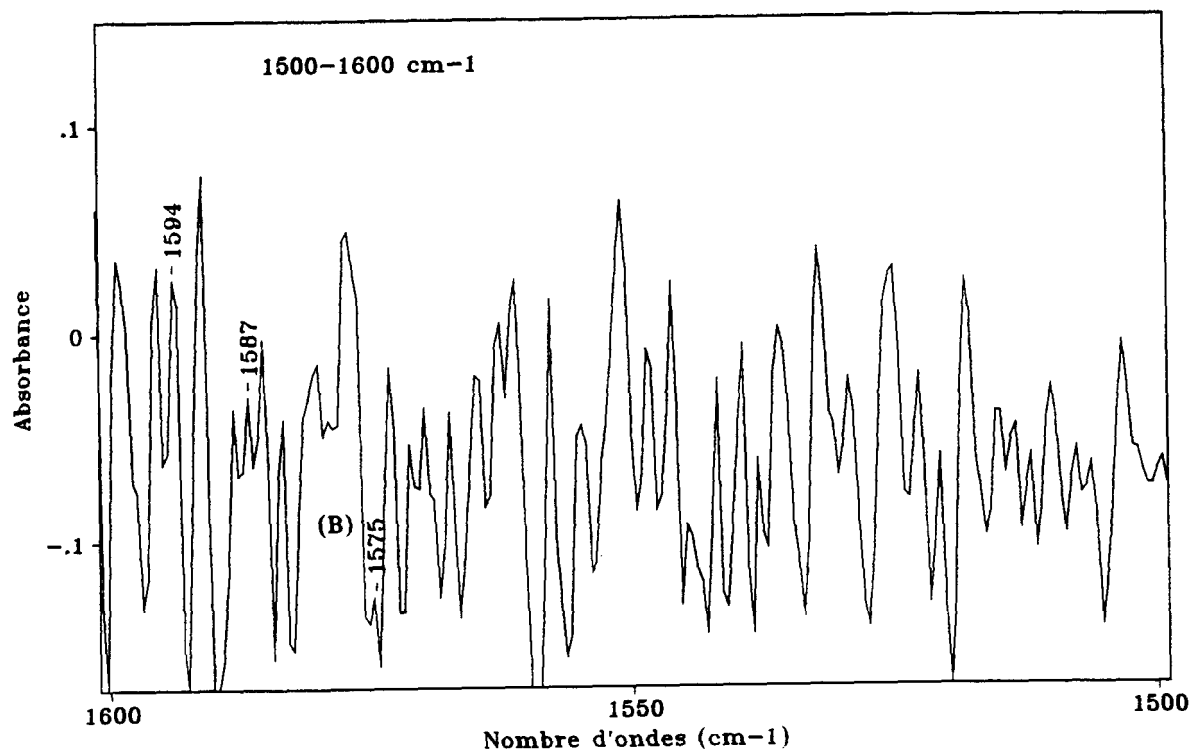
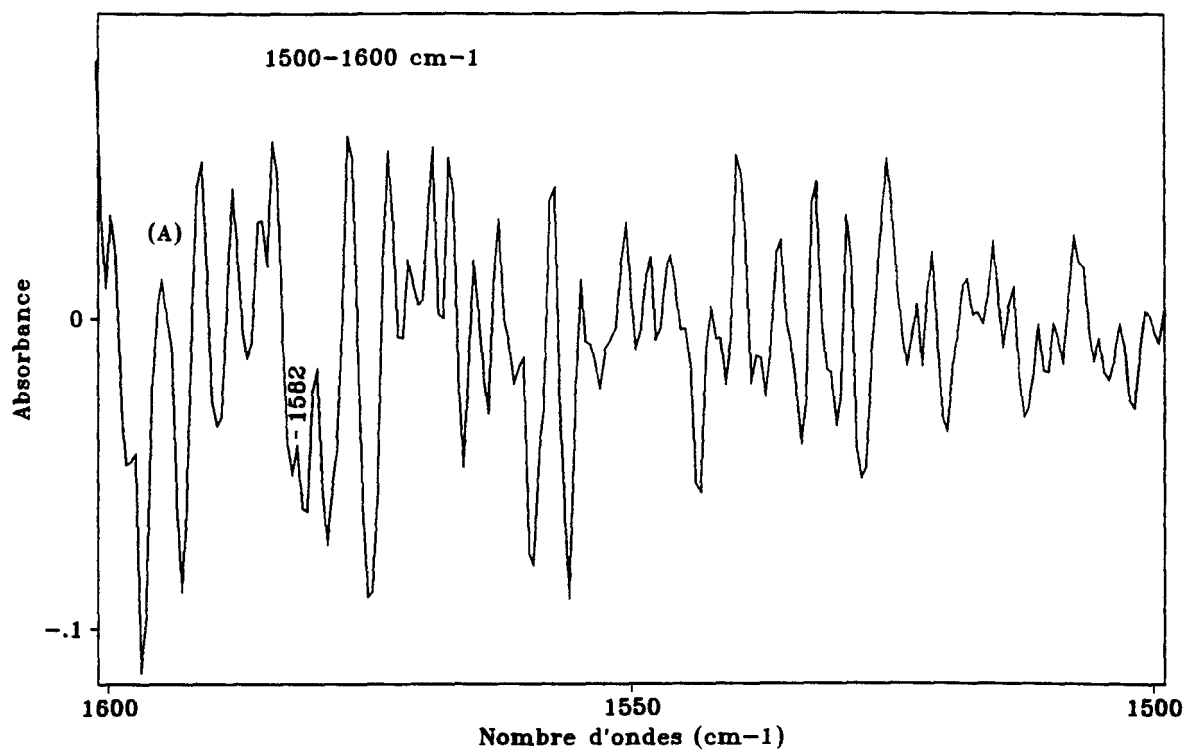


Figure 27. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 cm<sup>-1</sup>.

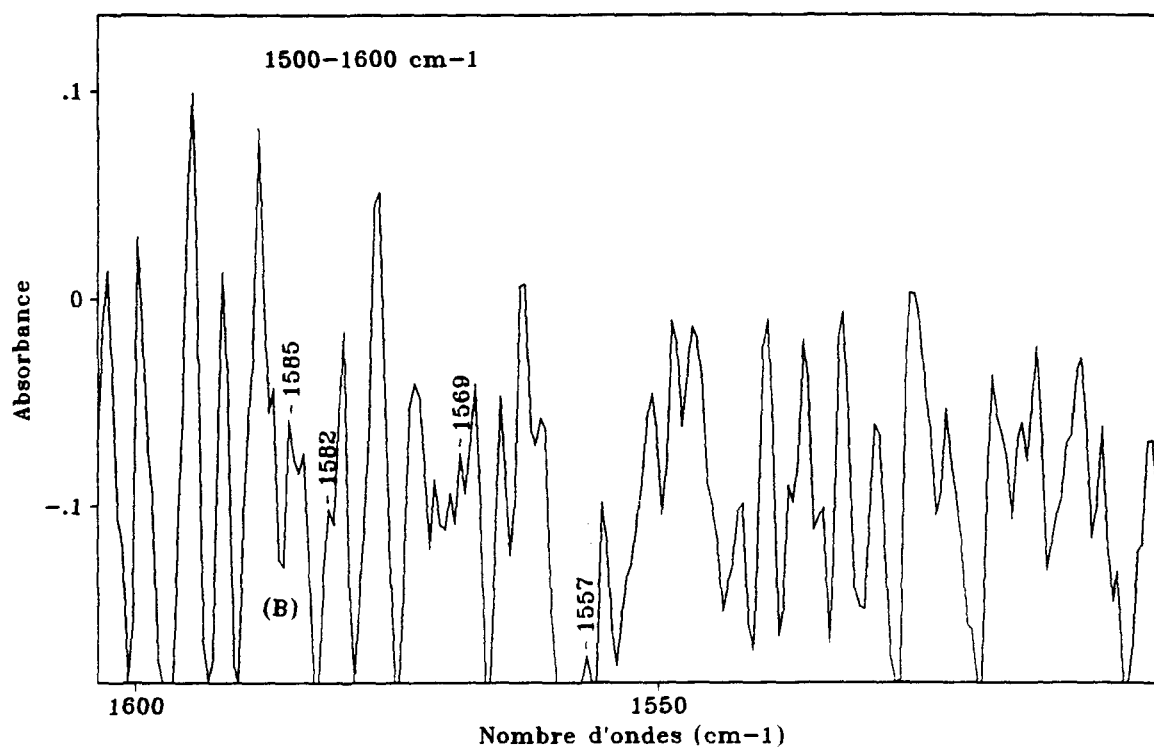
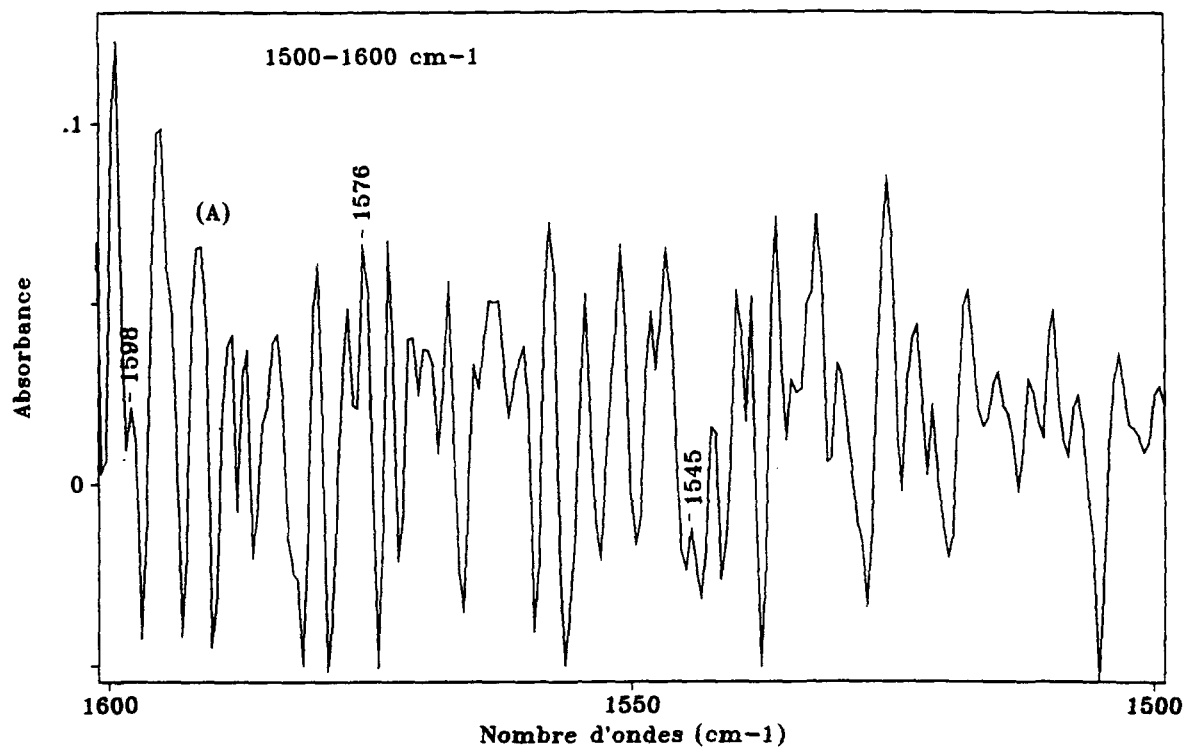


Figure 28. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

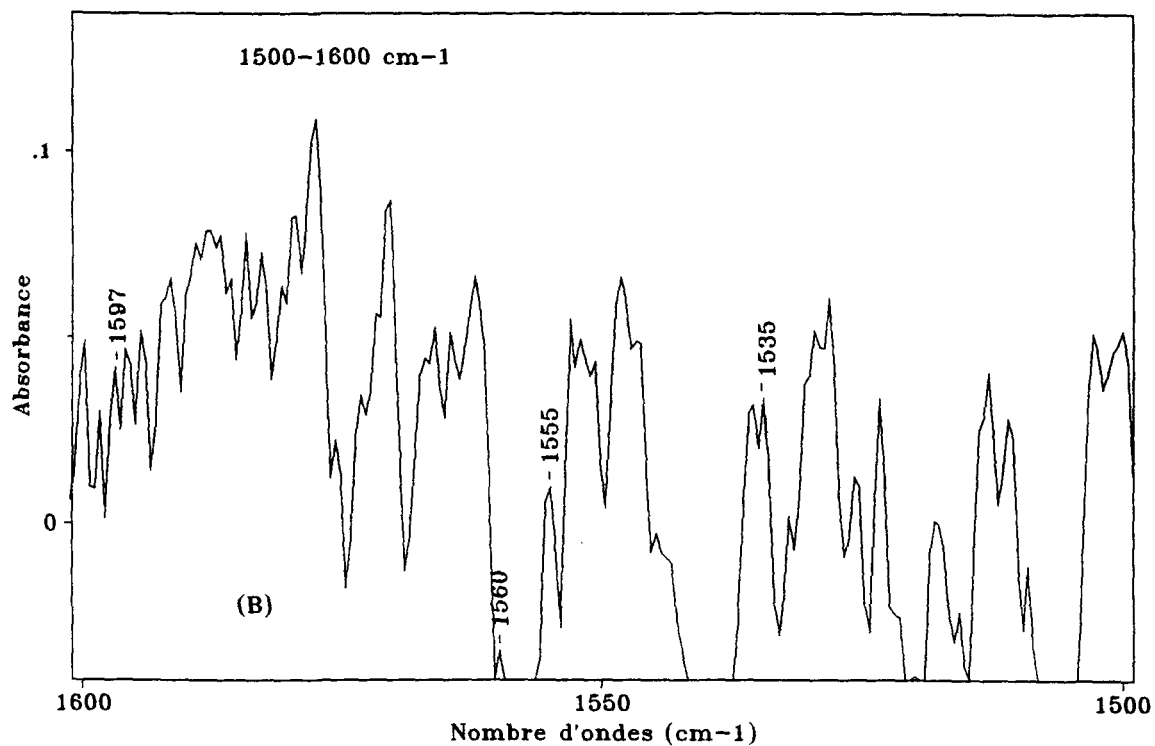
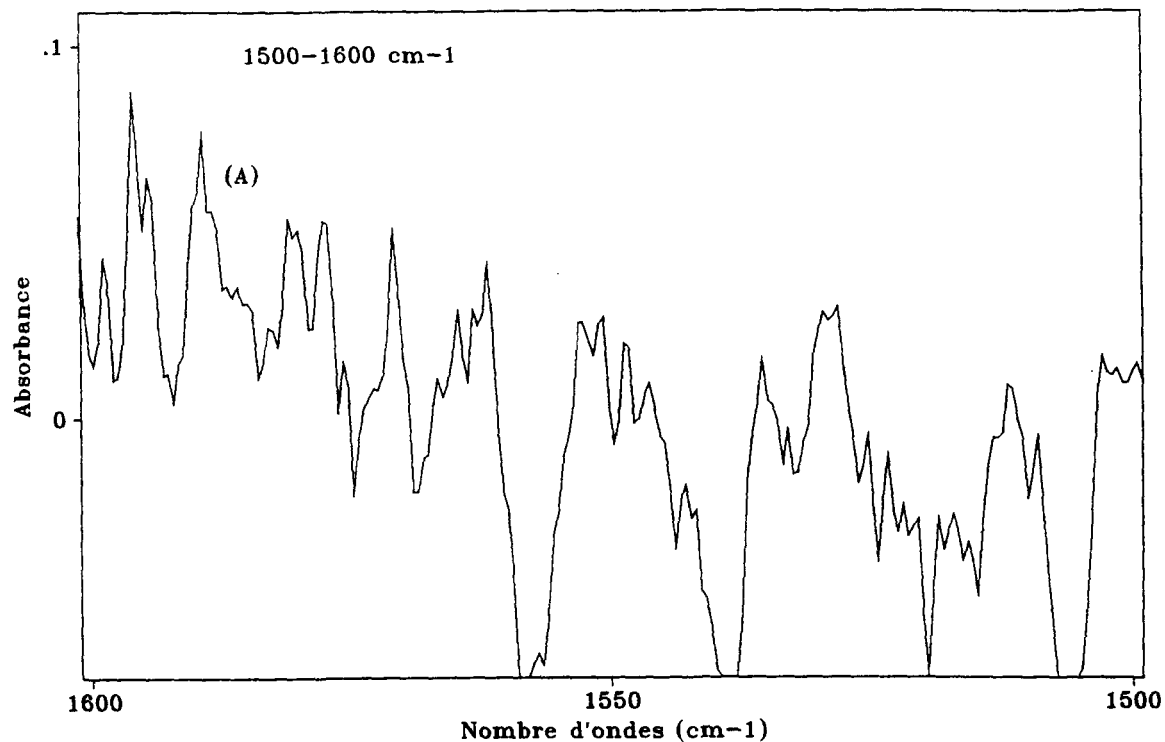


Figure 29. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

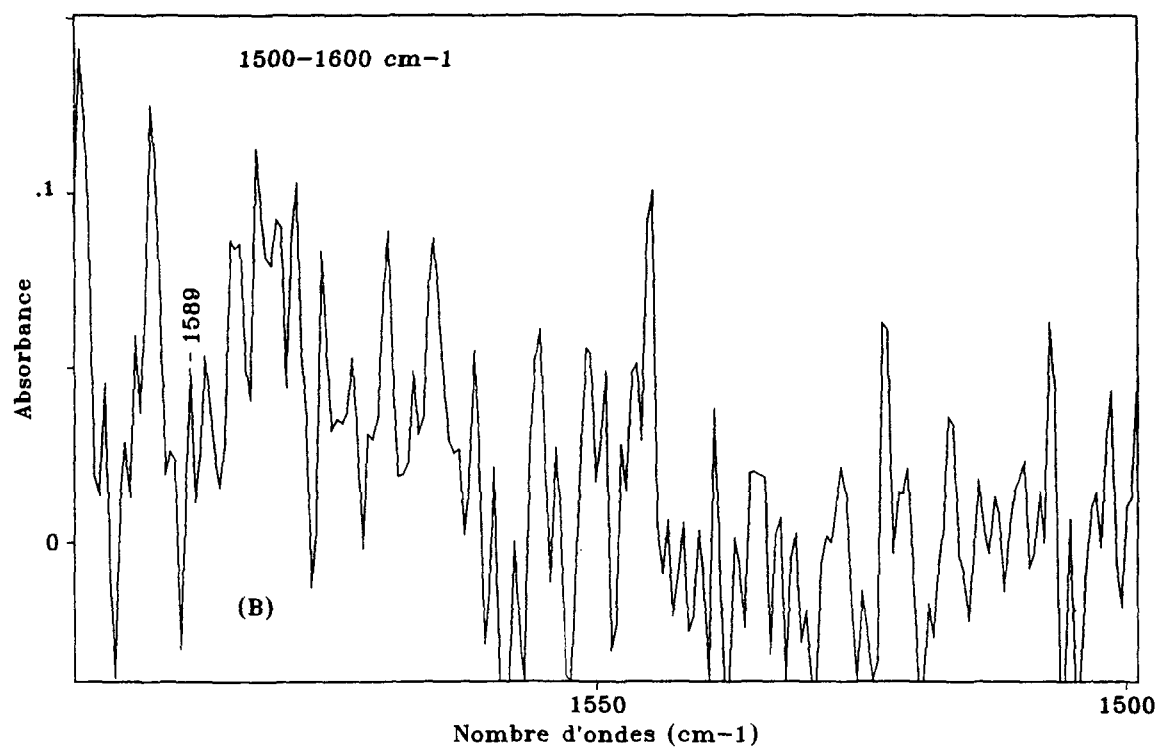
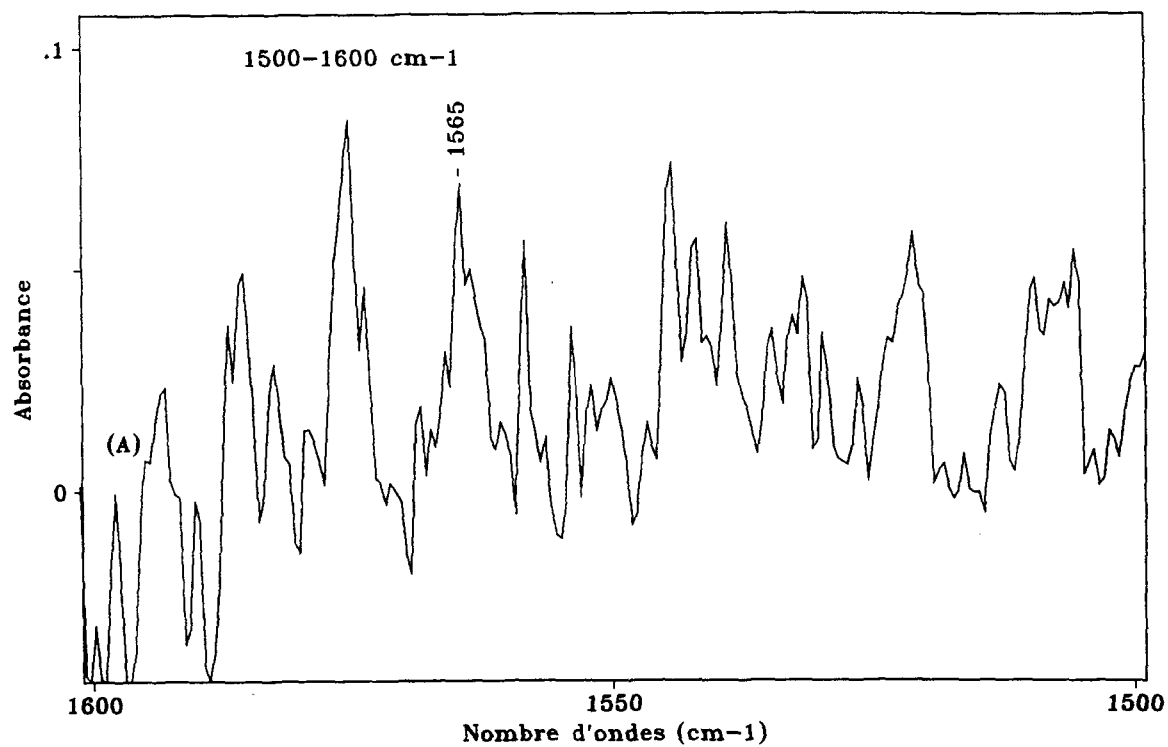


Figure 30. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

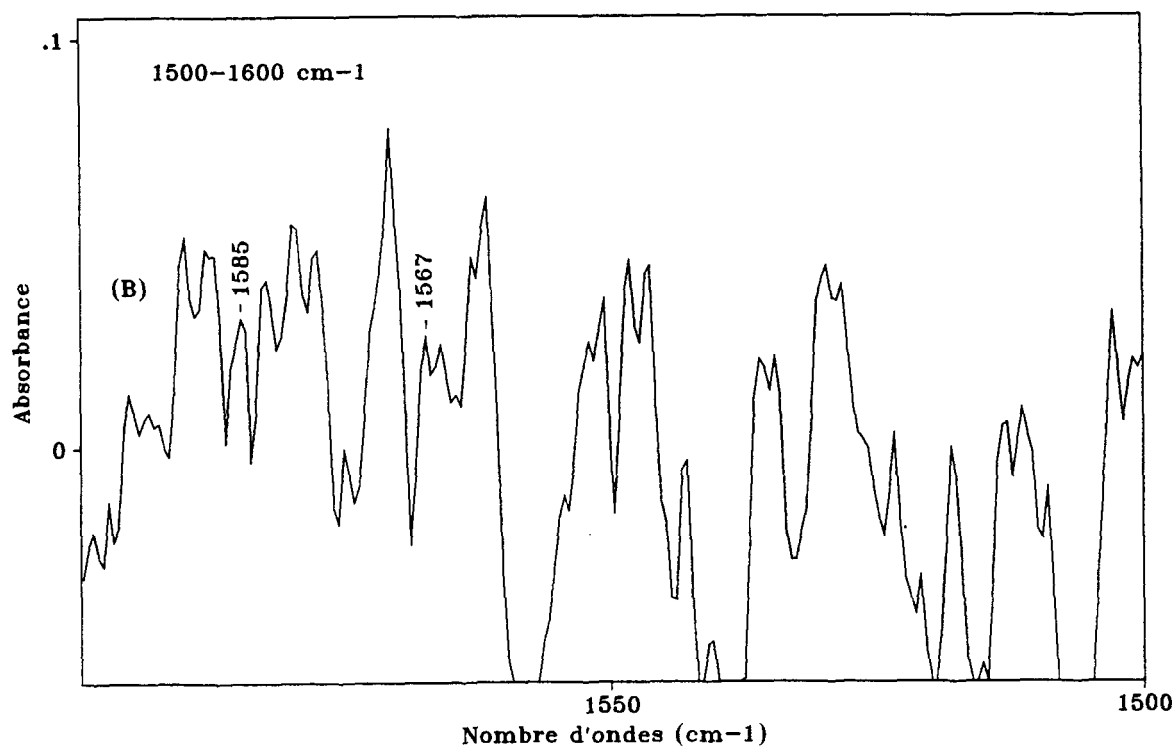
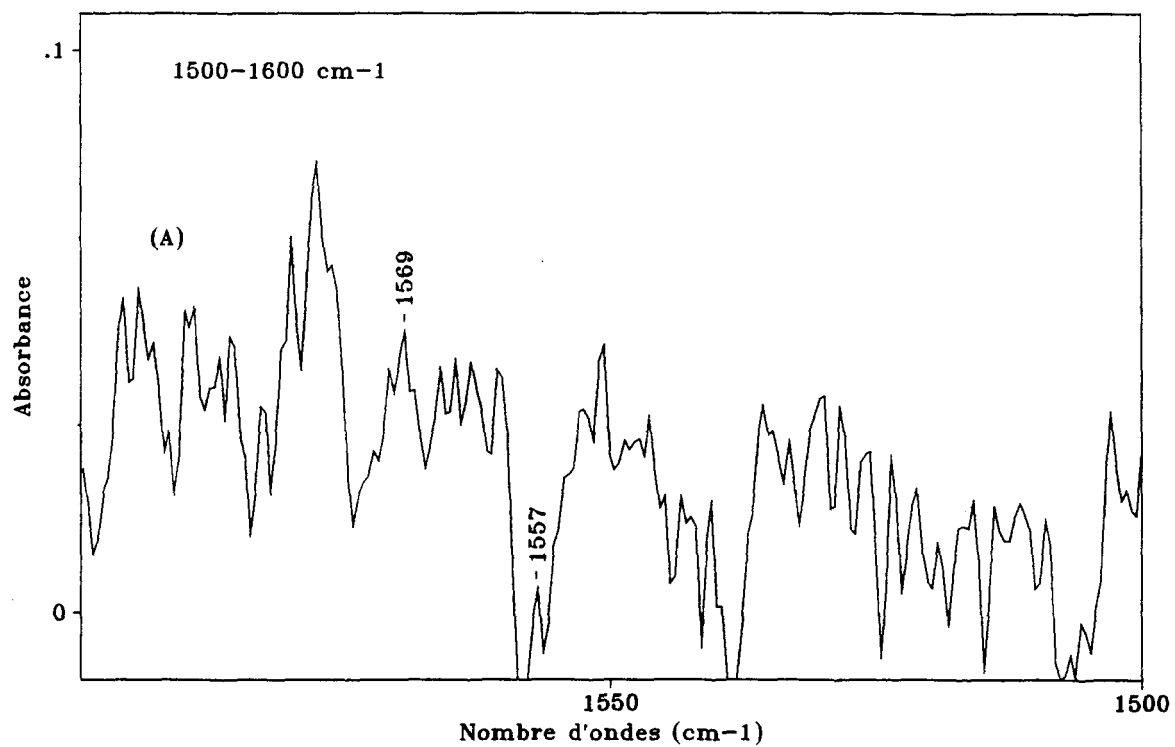


Figure 31. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600 cm<sup>-1</sup>.



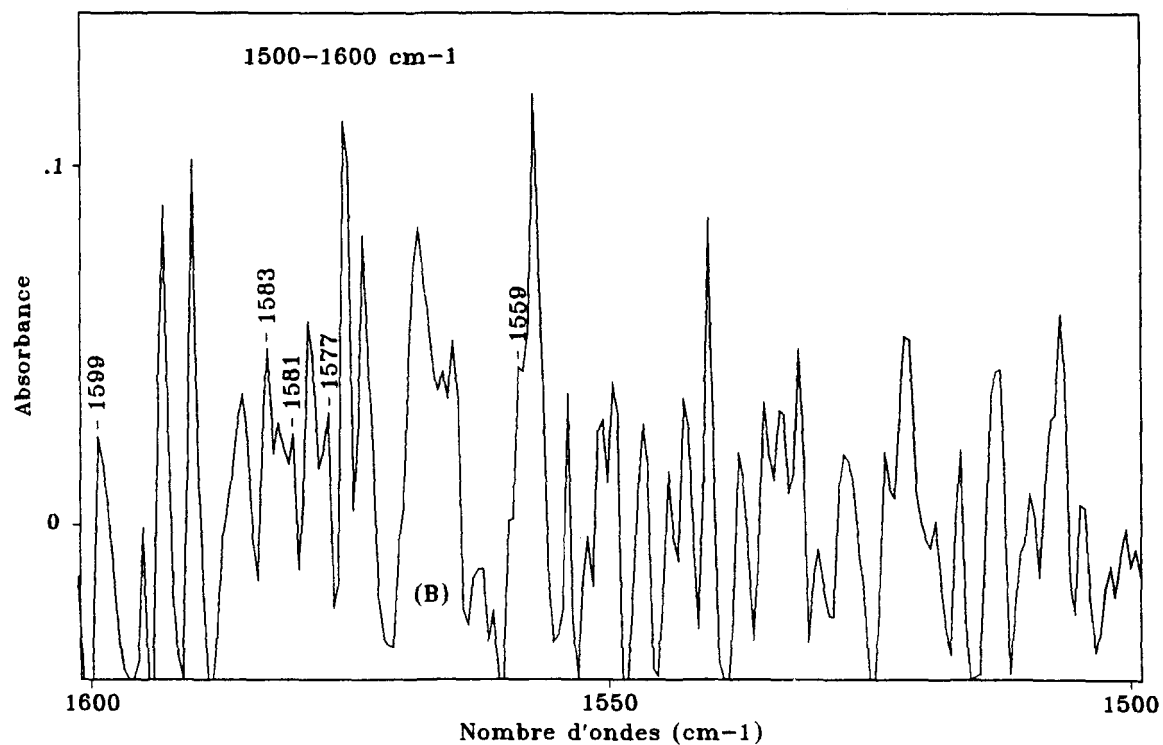
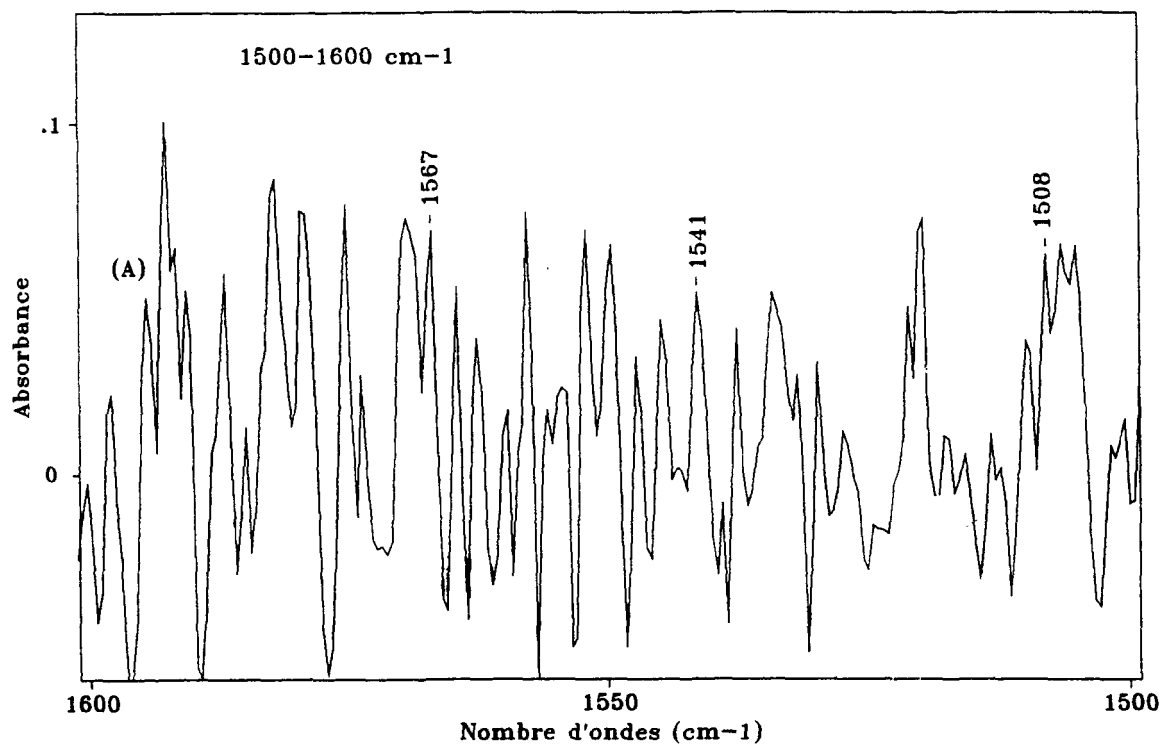


Figure 32. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

tous les spectres des échantillons témoins sauf après 156 heures (Figure 29A). Tous les pics disparus et les nouveaux pics ont été répertoriés respectivement dans les tableaux III et IV.

Le tableau III présente une série de pics disparus dans trois spectres des échantillons témoins entre 1565 et 1569  $\text{cm}^{-1}$ . L'absence de ces pics a été observée à 1565, 1567 et 1569  $\text{cm}^{-1}$  respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 324 heures (Figure 30A), après 732 heures (Figure 32A) et après 516 heures (Figure 31A). D'autres pics disparus à 1541 et 1545  $\text{cm}^{-1}$  ont été enregistrés respectivement dans les spectres des échantillons témoins après 732 heures (Figure 32A) et après 84 heures (Figure 28A). Il en est de même pour les pics disparus à 1508, 1557, 1576, 1582 et 1598  $\text{cm}^{-1}$  observés respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 732 heures (Figure 32A), après 516 heures (Figure 31A), après 84 heures (Figure 28A), après 12 heures (Figure 27A) et après 84 heures (Figure 28A). Les pics disparus à 1508, 1541 et 1545  $\text{cm}^{-1}$  peuvent correspondre à une vibration de valence de la liaison C-N ou la liaison C=N ou même à une vibration de déformation de la liaison N-H (Avram et Mateescu, 1970). Nous pensons qu'il est plus probable de faire correspondre ces derniers pics aux vibrations de valence de la liaison C-N. En effet, l'absence de ces pics a été observée dans la région de vibration de la liaison C-N qui correspond à la région 1450-1540  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970); de même Rao (1963) a montré que la présence du cuivre peut provoquer le déplacement des pics de cette région vers des nombres d'ondes plus bas. La série de pics disparus à 1565, 1567, et 1569  $\text{cm}^{-1}$  peut correspondre aux vibrations de déformation de la liaison N-H qui présente une région d'absorbance comprise entre 1500 et 1600  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970). Il en est de même pour les pics disparus à 1557, 1576 et 1582  $\text{cm}^{-1}$ . Celui à 1598  $\text{cm}^{-1}$  peut être attribuable aussi bien à une vibration de déformation de la liaison N-H ou qu'à une vibration de valence de la liaison C=O.

Tableau III. Pics disparus pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a
1582	0,016	1545	0,014			1565	0,031	1557 1569	0,018 0,009	1508	0,021
										1541	0,031
		1576	0,069							1567	0,038
		1598	0,034								

Tableau IV. Nouveaux pics pour la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a
1575	0,012			1535	0,014					1559	0,01
				1555	0,009						
		1557	0,014	1560	0,025						
		1569	0,015								
								1567	0,014	1577	0,015
										1581	0,01
1587	0,018	1585	0,021			1589	0,011	1585	0,016	1583	0,021
1594	0,065									1599	0,056

Le tableau IV présente deux séries de nouveaux pics compris entre 1557 et 1560  $\text{cm}^{-1}$  et entre 1583 et 1589  $\text{cm}^{-1}$ . Les pics à 1557, 1559 et 1560  $\text{cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 84 heures (Figure 28B), après 732 heures (Figure 32B) et après 156 heures (Figure 29B). Les pics à 1583, 1585, 1585, 1587 et 1589  $\text{cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 732 heures (Figure 32B), après 516 heures (Figure 31B), après 84 heures (Figure 28B), après 12 heures (Figure 27B) et après 324 heures (Figure 30B). Le tableau IV présente aussi d'autres nouveaux pics à 1567 et à 1569  $\text{cm}^{-1}$  qui se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 516 heures (Figure 31B) et après 84 heures (Figure 28B); les pics à 1575 et 1577  $\text{cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 27B) et après 732 heures (Figure 32B). Nous remarquons aussi la présence de deux autres nouveaux pics à 1535 et 1555  $\text{cm}^{-1}$  dans le spectre de l'échantillon expérimental après 156 heures (Figure 29B). Il est fort possible que ces pics cités ci-dessus puissent correspondre aux vibrations de déformation de la liaison N-H du groupe  $\text{NH}_2$  (Rao, 1963; Avram et Mateescu, 1970). En effet, si nous observons la série de nouveaux pics compris entre 1557 et 1560  $\text{cm}^{-1}$ , nous pouvons supposer, sous toute réserve, que ces pics peuvent être issus d'un déplacement de la série de pics disparus compris entre 1565 et 1569  $\text{cm}^{-1}$ . Cependant, nous n'avons pas noté de nouveaux pics dans les spectres de l'échantillon expérimental après 324 heures et après 516 heures compris entre 1557 et 1560  $\text{cm}^{-1}$ ; de même, il n'y a pas de disparition de pics dans les spectres de l'échantillon témoin après 84 heures et après 156 heures, compris entre 1565 et 1569  $\text{cm}^{-1}$ . Il faut toutefois mentionner que pour sélectionner ces pics, leur intensité devait être supérieure à la répétabilité de l'appareil; il est donc possible que nous ayons eu de nouveaux pics ou des pics disparus dans les spectres cités ci-dessus mais qui ont été confondus avec le bruit de fond ou la répétabilité de l'appareil.

Avram et Mateescu (1970) ont montré que, dans le cas des protéines, l'intensité de la région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  (amide II) est trois fois plus petite que l'intensité de la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$  (amide I), ce qui appuie nos hypothèses. La série de nouveaux pics compris entre 1583 et 1589  $\text{cm}^{-1}$  peut être issue, suite à la présence de cuivre, des vibrations de la liaison N-H du groupe  $\text{NH}_3^+$  qui présente une bande d'absorbance comprise entre 1600-1640  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970). Enfin, les deux nouveaux pics à 1594 et 1599  $\text{cm}^{-1}$  qui ont été enregistrés respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 27B) et après 732 heures (Figure 32B) peuvent être issus des déplacements de vibration de la liaison O-H causés par l'interaction du cuivre sur les molécules d'eau. Dans ce sens, Johnston et *al.* (1992) ont remarqué que, pour la molécule  $\text{H}_2\text{O}$  qui a une vibration entre 1600 et 1650  $\text{cm}^{-1}$ , son intensité augmente et son nombre d'ondes diminue quand elle interagit avec le métal. En effet, les intensités de ces derniers pics 0,065 et 0,056 u.a. sont assez élevées par rapport aux autres pics ce qui appuie les hypothèses avancées.

La bande amide II a été attribuée à une vibration de déformation de la liaison N-H (Avram et Mateescu, 1970). Nous pouvons supposer que l'apparition de certains nouveaux pics est peut-être due à l'interaction du cuivre et du groupe  $\text{NH}_2$ . Dans ce sens, Rao (1963) a montré que les vibrations de la région amide II sont considérablement influencées par une interaction avec le métal. Il a interprété ce phénomène en se basant sur l'affinité de l'azote du groupe  $\text{NH}_2$  ou  $\text{NH}_3^+$  de la chaîne peptidique pour les métaux comme le cuivre, le fer et le magnésium. D'autre part, il est possible que les nouveaux pics ne soient pas tous dus à l'interaction cuivre-N-H, mais d'autres facteurs peuvent être responsables des déplacements des pics vers des nombres d'ondes plus bas ou plus simplement de l'apparition de nouveaux pics surtout dans la région amide II. En effet, Avram et Mateescu (1970) ont interprété la région amide II comme étant due à une vibration complexe à laquelle participent tous les atomes du groupe; la liaison

peptidique implique une conjugaison interne appréciable qui peut être perturbée par une rotation de la liaison C-N, ce qui amène une certaine variation au niveau des nombres d'ondes et des intensités des pics au sein de la région spectrale de l'amide II.

### 3.2.3 Spectres infrarouges pour la région 1650-1750 cm<sup>-1</sup>

Plusieurs études ont montré que la région 1650-1750 cm<sup>-1</sup> correspond à la bande amide I. Remsen et Freeman (1991) puis Brischwein et *al.* (1993) ont montré que la bande amide I correspond à la région 1600-1700 cm<sup>-1</sup> pour les spectres infrarouges de protéines. Jakobsen et Wasacz (1990) ont limité leur région de l'amide I entre 1650 et 1715 cm<sup>-1</sup>. Nous avons décidé d'étudier seulement la région 1650-1750 cm<sup>-1</sup> afin d'éviter les interférences des molécules d'eau. Nous avons considéré que l'étude des pics au voisinage de la bande 1610-1640 cm<sup>-1</sup> risque de nous induire en erreur (Johnston et *al.*, 1992) surtout que la plupart des fonctions essentielles des macronucléides sont grandement influencées par la liaison hydrogène (Fischer et *al.*, 1994). En effet, la bande 1610-1640 cm<sup>-1</sup> correspond à la région de vibration de la molécule d'eau qui est très influencée par les échanges de cations métalliques (Johnston et *al.*, 1992); également Fischer et *al.* (1994) ont montré que la région de vibration des amines tend à s'intégrer à celle de l'eau. Avram et Mateescu (1970) ont interprété la bande amide I par la vibration de valence de la liaison C=O du groupe CONH, tandis que Fischer et *al.* (1994) ont attribué les effets de vibration des acides aminés dans cette région aux groupes carboxyliques.

Tous les spectres des échantillons témoins et expérimentaux des protéines de cellules *S. quadricauda* (Figures 33, 34, 35, 36, 37 et 38) ont présenté presque la même allure où nous observons que les pics au voisinage de 1650 cm<sup>-1</sup> ont une intensité assez élevée par rapport aux autres pics. Après avoir analysé nos spectres, nous avons remarqué des pics disparus dans

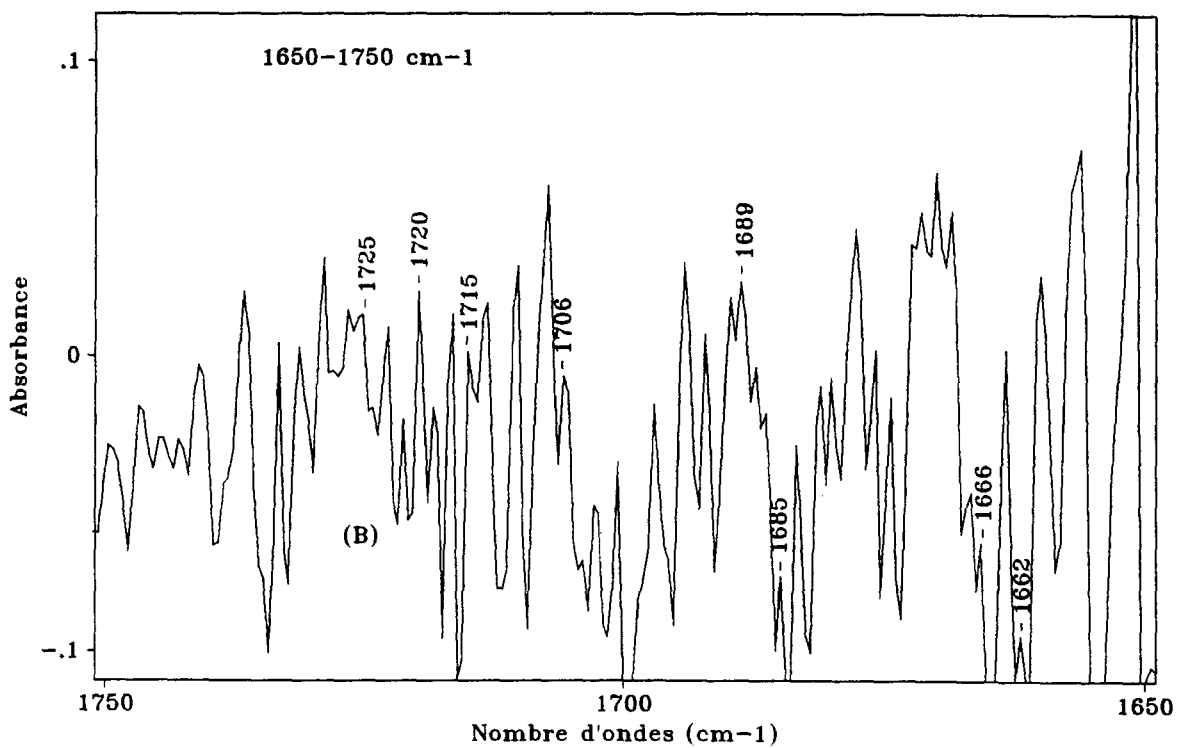
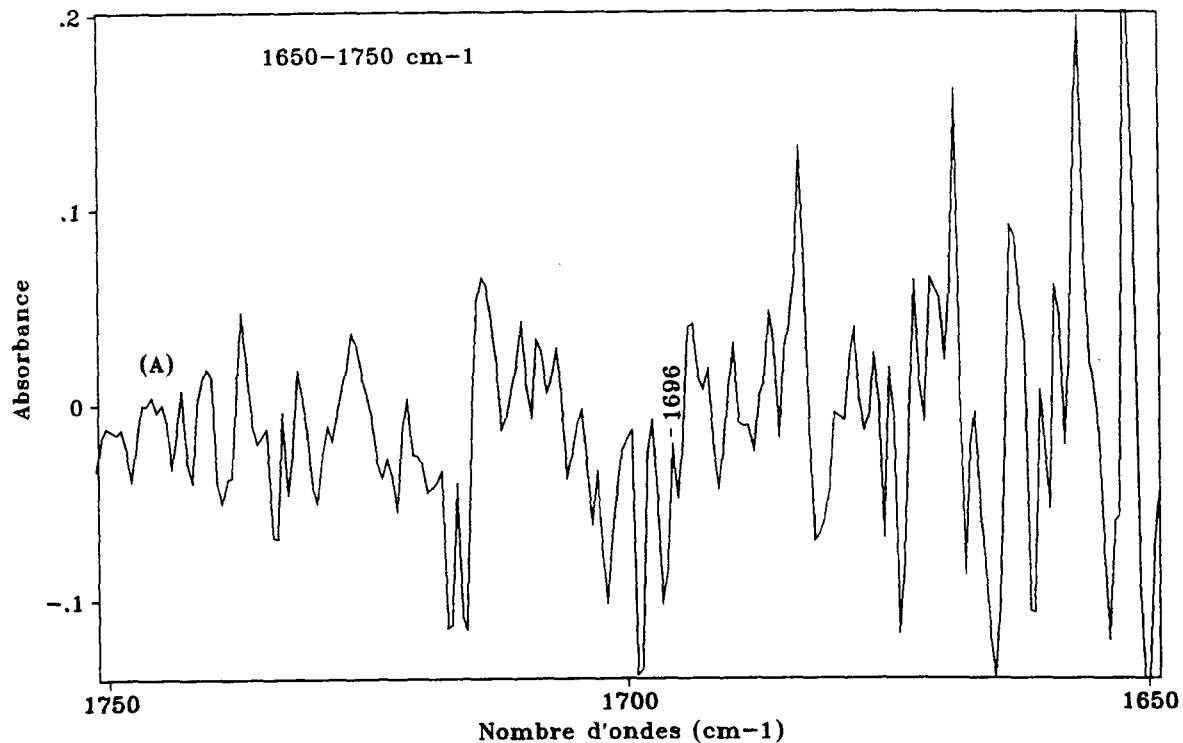


Figure 33. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

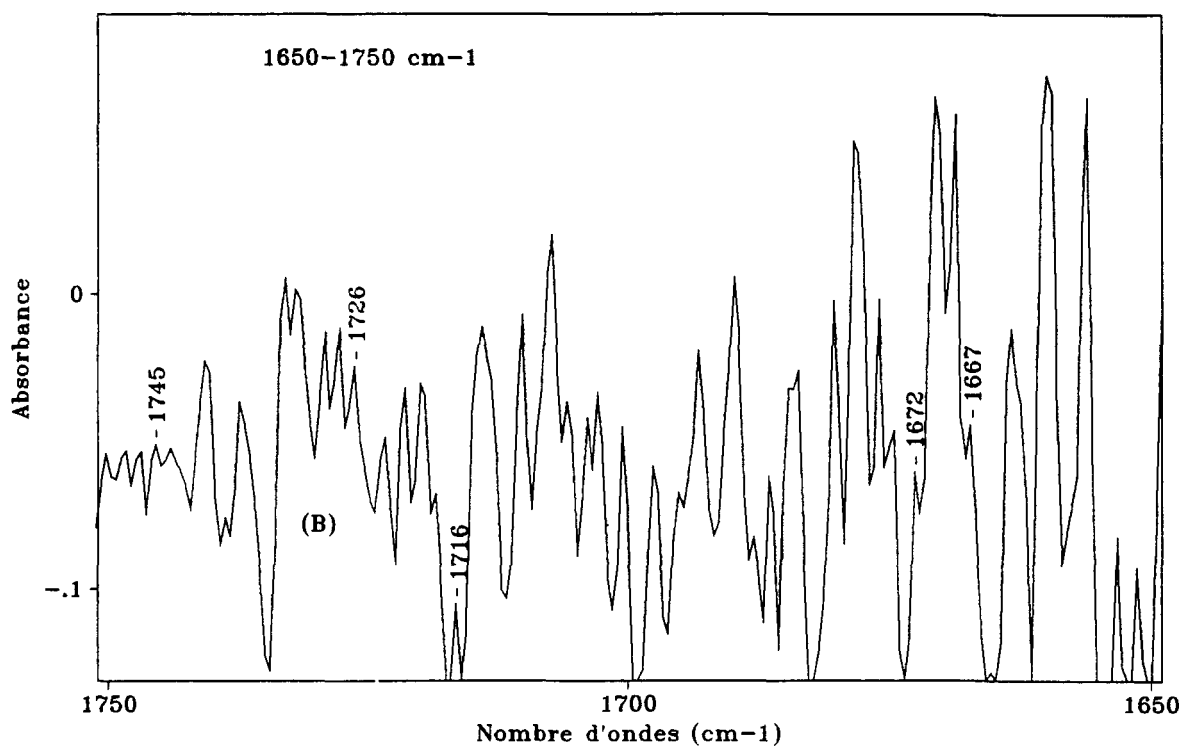
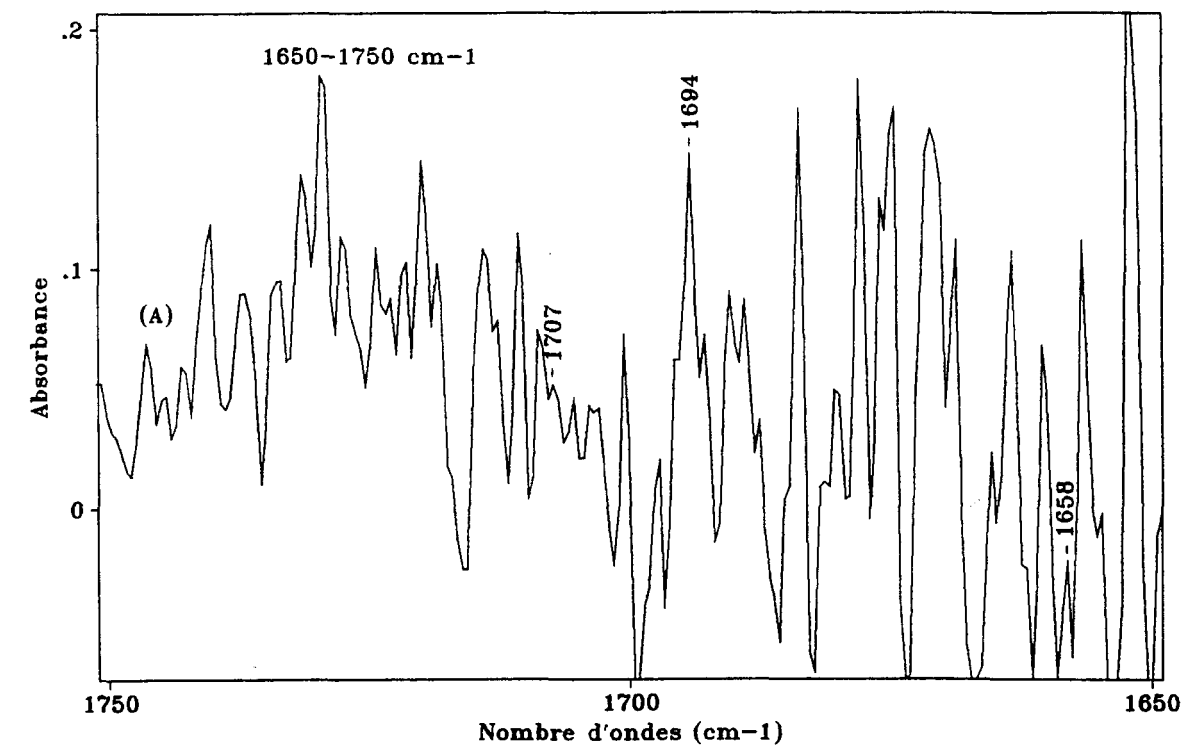


Figure 34. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région  $1650\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ .



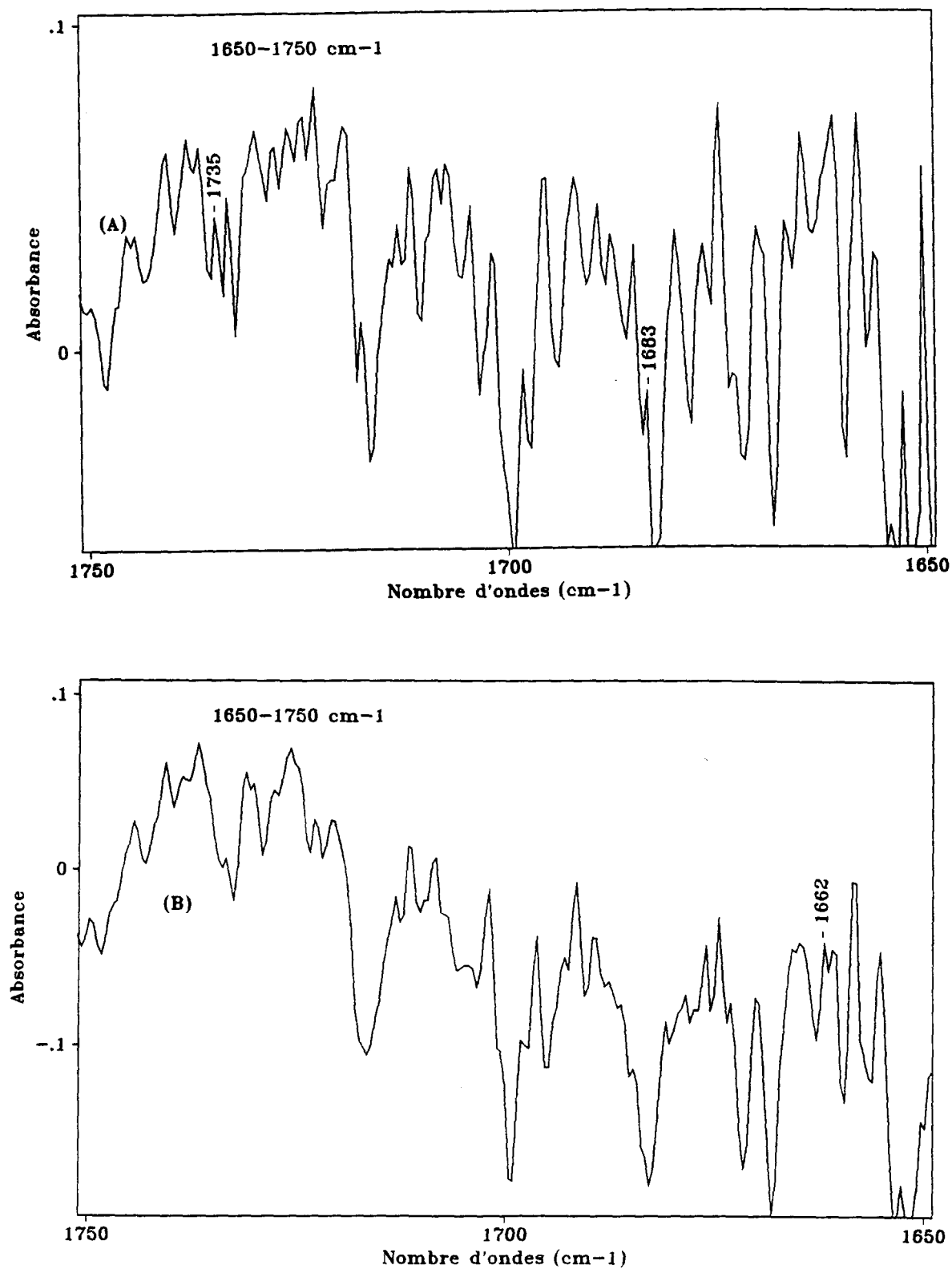


Figure 35. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750 cm<sup>-1</sup>.

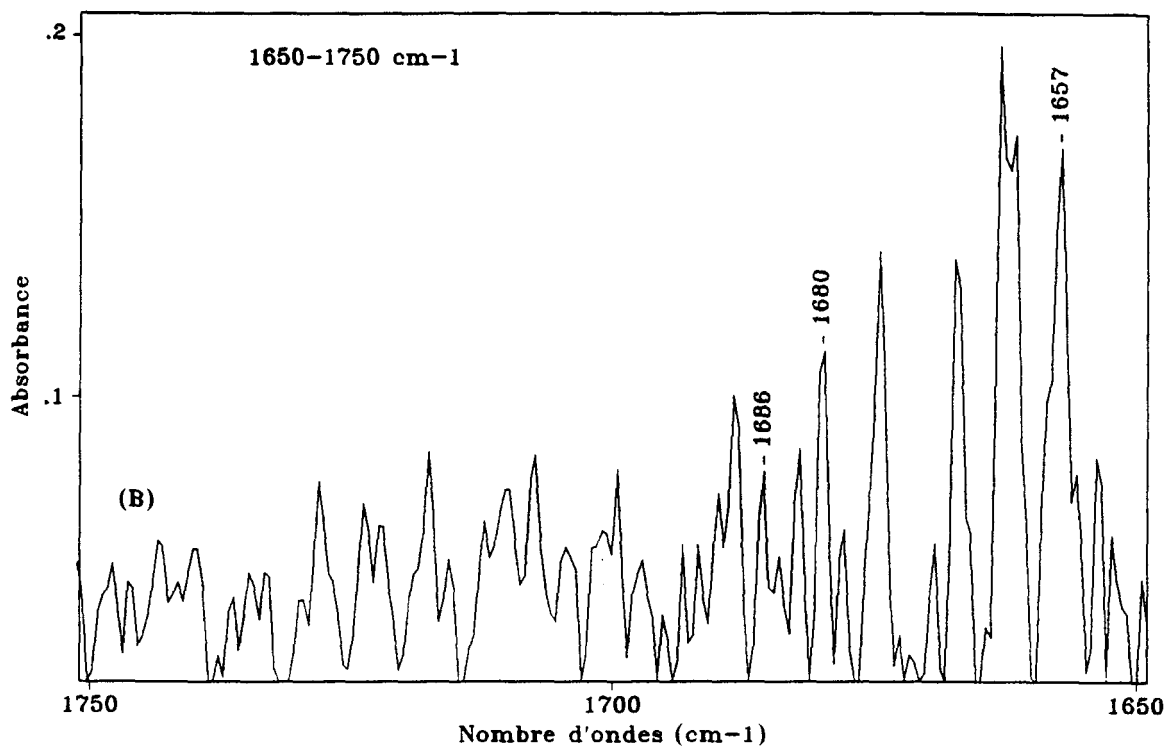
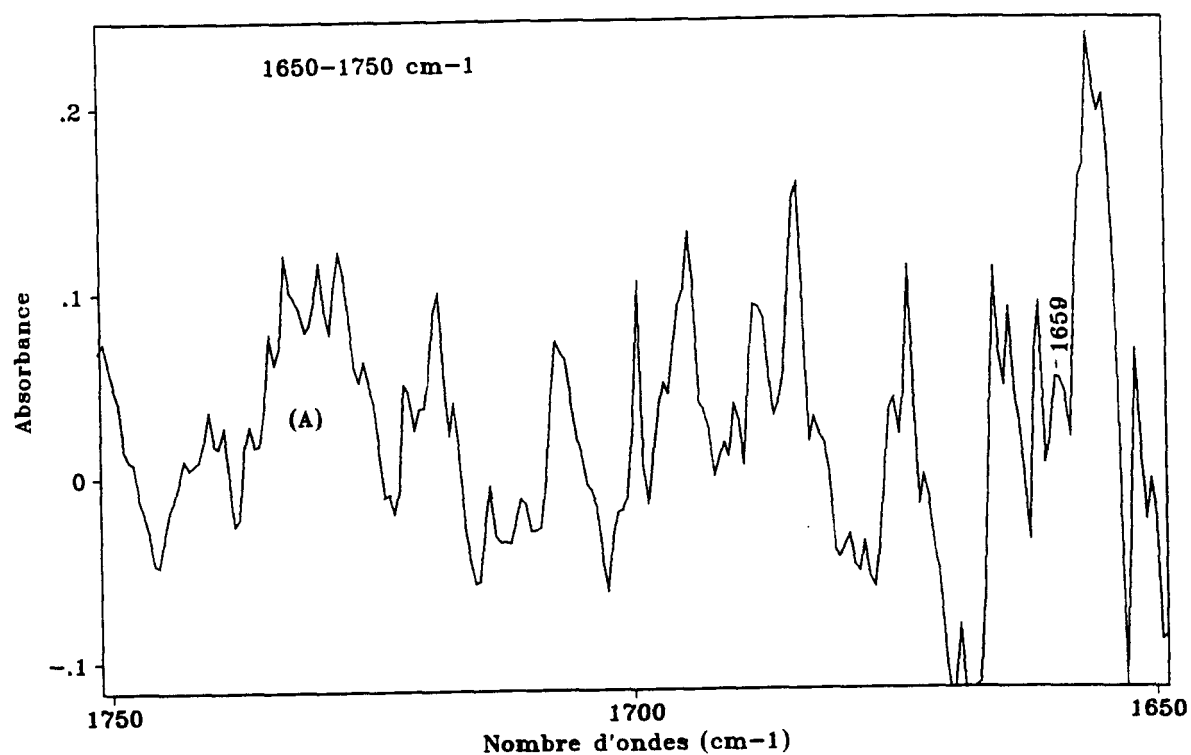


Figure 36. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

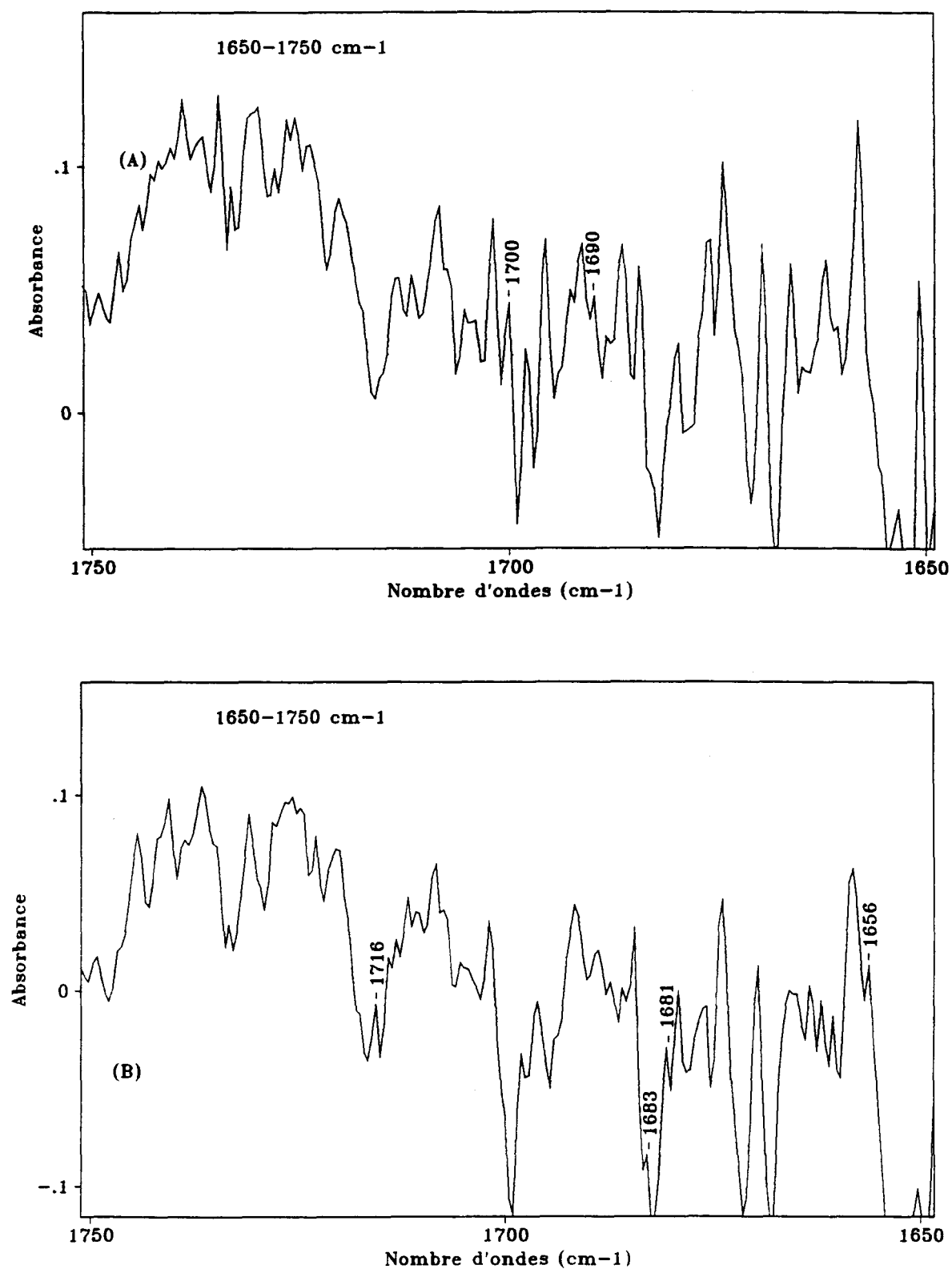


Figure 37. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

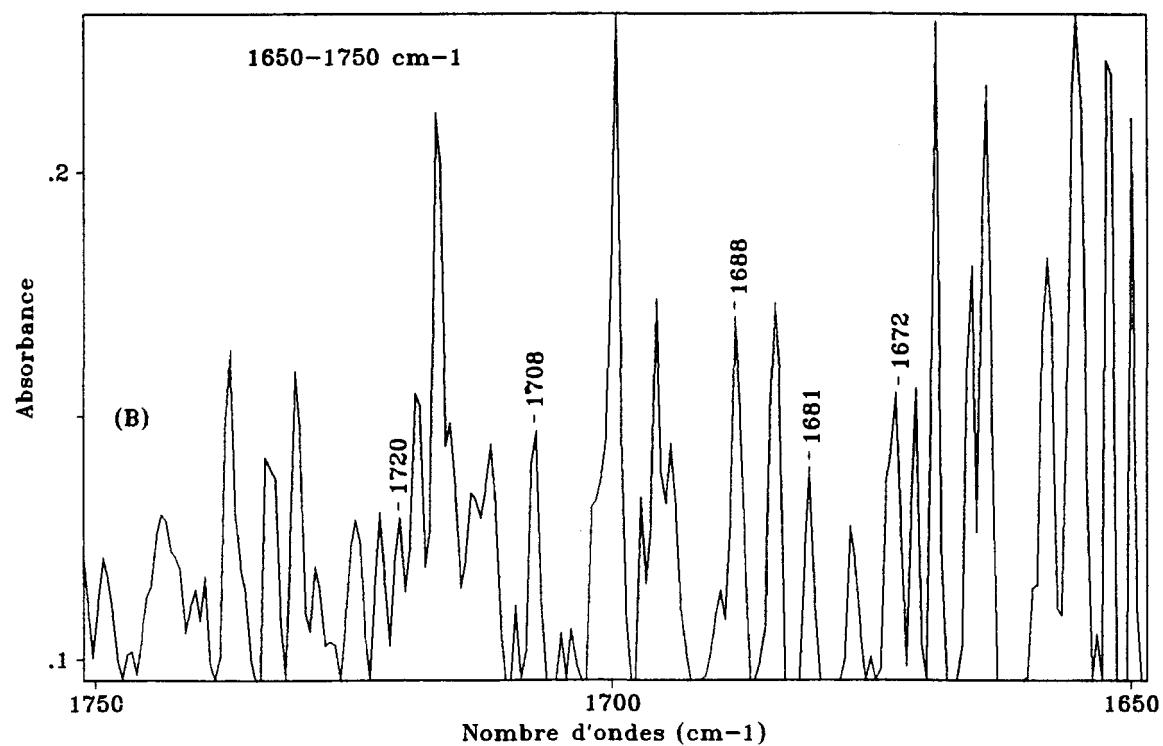
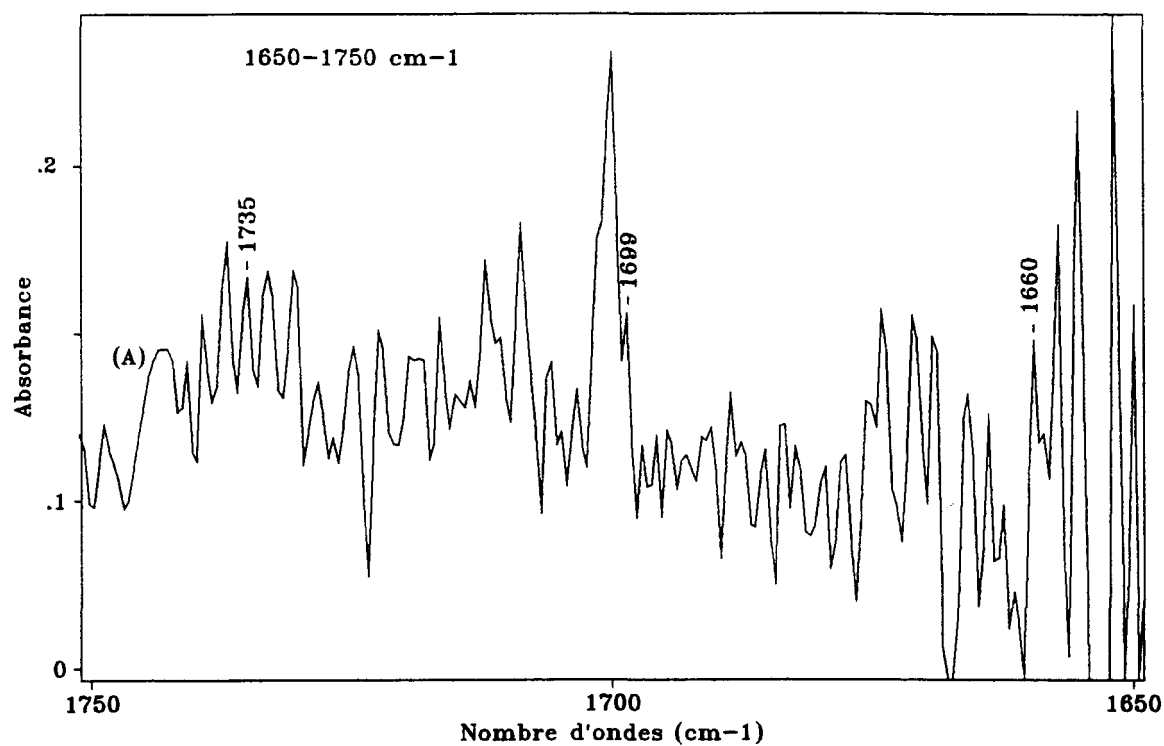


Figure 38. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

tous les spectres des échantillons témoins et la présence de nouveaux pics dans tous les spectres des échantillons expérimentaux. Tous les pics disparus et les nouveaux pics ont été répertoriés respectivement dans les tableaux V et VI.

Le tableau V présente deux séries de pics disparus compris entre 1658 et 1660  $\text{cm}^{-1}$  et entre 1690 et 1696  $\text{cm}^{-1}$ . Ces pics disparus ont été enregistrés à 1658, 1659 et 1660  $\text{cm}^{-1}$ , respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 84 heures (Figure 34A), après 324 heures (Figure 36A) et après 732 heures (Figure 38A). Les pics disparus à 1690, 1694 et 1696  $\text{cm}^{-1}$  ont été observés respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 516 heures (Figure 37A), après 84 heures (Figure 34A) et après 12 heures (Figure 33A). D'autres pics disparus ont été enregistrés à 1699 et 1700  $\text{cm}^{-1}$ , respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 732 heures (Figure 38A) et après 516 heures (Figure 37A). Le pic disparu à 1735  $\text{cm}^{-1}$  a été enregistré dans les deux spectres de l'échantillon témoin après 156 heures (Figure 35A) et après 732 heures (Figure 38A). Il en est de même pour les pics disparus à 1683 et 1707  $\text{cm}^{-1}$  observés respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 156 heures (Figure 35A) et après 84 heures (Figure 34A).

Les pics disparus à 1658, 1659 et 1660  $\text{cm}^{-1}$  peuvent correspondre à une vibration de déformation asymétrique du groupe  $\text{NH}_3^+$  dont la bande d'absorbance est comprise entre 1610 et 1660  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970). La série de pics disparus à 1690, 1694 et 1696  $\text{cm}^{-1}$  peut correspondre aux vibrations de la liaison C=O dont la région d'absorbance est comprise entre 1670 et 1750  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970). En effet, Brischwein et *al.* (1993) ont montré que la vibration de la liaison C=O de la glutamine est comprise entre 1670 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  et celle de l'asparagine est de 1680  $\text{cm}^{-1}$ . Il en est de même pour les pics disparus à 1683, 1699, 1700 et 1707  $\text{cm}^{-1}$  qui ne peuvent correspondre qu'à des vibrations de la liaison C=O.

Tableau V. Pics disparus pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a
<b>1696</b>	0,045	<b>1658</b>	0,053	1683	0,015	<b>1659</b>	0,019	1690 1700	0,016 0,03	<b>1660</b>	0,063
		<b>1694</b>	0,089							1699	0,03
		1707	0,022							1735	0,022
				1735	0,017						

Tableau VI. Nouveaux pics pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en $\text{cm}^{-1}$	Intensité en u.a
<b>1662</b>	0,073	1667 1672	0,062 0,046	<b>1662</b>	0,015	<b>1657</b>	0,028	<b>1656</b>	0,04	1672	0,037
1666	0,058										
<b>1685</b>	0,064										
<b>1689</b>	0,028	1716	0,06			<b>1680</b> <b>1686</b>	0,023 0,019	<b>1681</b> <b>1683</b>	0,028 0,015	<b>1681</b>	0,054
1706	0,04									<b>1688</b>	0,076
<b>1715</b>	0,05									1708	0,03
1720	0,074									<b>1720</b>	0,02
1725	0,017	1726	0,023								
		1745	0,016								

Le pic disparu à  $1735\text{ cm}^{-1}$  peut correspondre aux vibrations de la liaison C=O des acides aminés à courte chaîne et dont la région d'absorbance est comprise entre  $1730$  et  $1750\text{ cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970).

Le tableau VI présente quatre séries de nouveaux pics qui ont été identifiés dans quatre des six spectres des échantillons expérimentaux de protéines de cellules *S. quadricauda*. Les pics à  $1656$ ,  $1657$ ,  $1662$  et  $1662\text{ cm}^{-1}$  ont été reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 516 heures (Figure 37B), après 324 heures (Figure 36B), après 156 heures (Figure 35B) et après 12 heures (Figure 33B). Les pics à  $1680$ ,  $1681$ ,  $1681$  et  $1685\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 324 heures (Figure 36B), après 516 heures (Figure 37B), après 732 heures (Figure 38B) et après 12 heures (Figure 33B). Les pics à  $1683$ ,  $1686$ ,  $1688$ , et  $1689\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 516 heures (Figure 37B), après 324 heures (Figure 36B), après 732 heures (Figure 38B) et après 12 heures (Figure 33B). Enfin, les pics à  $1715$ ,  $1716$ ,  $1716$ , et  $1720\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 33B), après 84 heures (Figure 34B), après 516 heures (Figure 37B) et après 732 heures (Figure 38B). Le tableau VI présente également d'autres nouveaux pics à  $1666$  et  $1667\text{ cm}^{-1}$  enregistrés respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 33B) et après 84 heures (Figure 34B), à  $1672\text{ cm}^{-1}$  observés dans les spectres de l'échantillon expérimental après 84 heures (Figure 34B) et après 732 heures (Figure 38B), à  $1706$  et  $1708\text{ cm}^{-1}$  observés respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 33B) et après 732 heures (Figure 38B), à  $1725$  et  $1726\text{ cm}^{-1}$  enregistrés respectivement dans les spectres de l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 33B) et après 84 heures (Figure 34B), et enfin les pics à  $1720$  et  $1745\text{ cm}^{-1}$  enregistrés respectivement dans les spectres de

l'échantillon expérimental après 12 heures (Figure 33B) et après 84 heures (Figure 34B).

Nous pensons que tous les pics cités ci-dessus peuvent correspondre aux vibrations de la liaison C=O dont la région d'absorbance est comprise entre 1660 et 1750  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963; Avram et Mateescu, 1970; Ganter et *al.*, 1991; Brischwein et *al.*, 1993; Fischer et *al.*, 1994). La série de nouveaux pics compris entre 1656 et 1662  $\text{cm}^{-1}$  peut être issue d'un déplacement de 30  $\text{cm}^{-1}$  des pics disparus compris entre 1690 et 1696  $\text{cm}^{-1}$ , suite à la présence de cuivre. En effet, Ganter et *al.* (1991) ont montré le déplacement de 24  $\text{cm}^{-1}$  vers des nombres d'ondes plus bas de la vibration de la liaison C=O dans le cas de la protéine la rhodopsine en présence du métal; de même Brischwein et *al.* (1993) ont enregistré des déplacements de 30 à 40  $\text{cm}^{-1}$  dans la protéine halocyanine en présence des ions de cuivre. Ces derniers auteurs ont interprété ces déplacements de la vibration de la liaison C=O par l'association des ions  $\text{Cu}^{2+}$  avec le CONH de la glycine qui a créé une liaison avec l'oxygène avec une distance de 0,3 nm.

La série de nouveaux pics compris entre 1715 et 1720  $\text{cm}^{-1}$  peut être également issue d'un déplacement de certaines vibrations de la liaison C=O des acides aminés dans des amides cycliques dont la région d'absorbance est comprise entre 1730 et 1780  $\text{cm}^{-1}$  (Rao, 1963). En effet, Rao (1963) n'a pas rejeté l'hypothèse que l'interaction pourrait s'effectuer entre le cuivre et les groupes carboxyliques des amides cycliques. Il faut mentionner que la nature de l'amide I, qu'elle soit cyclique, primaire, secondaire ou tertiaire, n'a pas d'effet sur le mécanisme d'interaction métal-protéine. Les nouveaux pics, les pics disparus ou les déplacements des pics peuvent être attribués à des vibrations de la liaison C=O du groupe CONH. Nous pouvons aussi admettre que l'existence de nouveaux pics peut être le résultat d'un changement de configuration de la protéine dû à la présence de cuivre (Rao, 1963).



### 3.2.4 Spectres infrarouges pour la région 2700-2800 $\text{cm}^{-1}$

La région spectrale de 2700 à 2800  $\text{cm}^{-1}$  des six échantillons témoins de protéines de cellules *S. quadricauda* présentent la même allure (Figures 39A, 40A, 41A, 42A, 43A et 44A) de même que pour les six échantillons expérimentaux (Figures 39B, 40B, 41B, 42B, 43B et 44B). Après avoir étudié nos spectres infrarouges, nous avons noté la présence de nouveaux pics dans tous les spectres des échantillons expérimentaux et des pics disparus dans ceux des échantillons témoins. Tous les pics disparus et les nouveaux pics ont été rassemblés respectivement dans les tableaux VII et VIII.

Nous remarquons que le tableau VII présente quatre séries de pics disparus entre 2709 et 2710  $\text{cm}^{-1}$ , entre 2751 et 2755  $\text{cm}^{-1}$ , entre 2757 et 2765  $\text{cm}^{-1}$  et entre 2790 et 2797  $\text{cm}^{-1}$ . Les pics disparus à 2709, 2709 et 2710  $\text{cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres des échantillons témoins après 732 heures (Figure 44A), après 324 heures (Figure 42A) et après 84 heures (Figure 40A). Les pics disparus à 2751, 2754 et 2755  $\text{cm}^{-1}$  ont été observés respectivement dans les spectres des échantillons témoins après 156 heures (Figure 41A), après 732 heures (Figure 44A) et après 516 heures (Figure 43A). Les pics disparus à 2757, 2759, 2760 et 2765  $\text{cm}^{-1}$  ont été enregistrés respectivement dans les spectres de l'échantillon témoin après 156 heures (Figure 41A), après 516 heures (Figure 43A), après 84 heures (Figure 40A) et après 12 heures (Figure 39A). Enfin, la série de pics disparus à 2790, 2794 et 2797  $\text{cm}^{-1}$  se sont reproduits respectivement dans les spectres des échantillons témoins après 156 heures (Figure 41A), après 324 heures (Figure 42A) et après 516 heures (Figure 43A). D'autres pics disparus à 2728 et 2735  $\text{cm}^{-1}$  ont été observés dans le spectre de l'échantillon témoin après 324 heures (Figure 42A), les pics à 2738, 2764, 2768 et 2776  $\text{cm}^{-1}$  ont été notés respectivement dans les spectres des échantillons témoins après 12 heures (Figure 39A), après

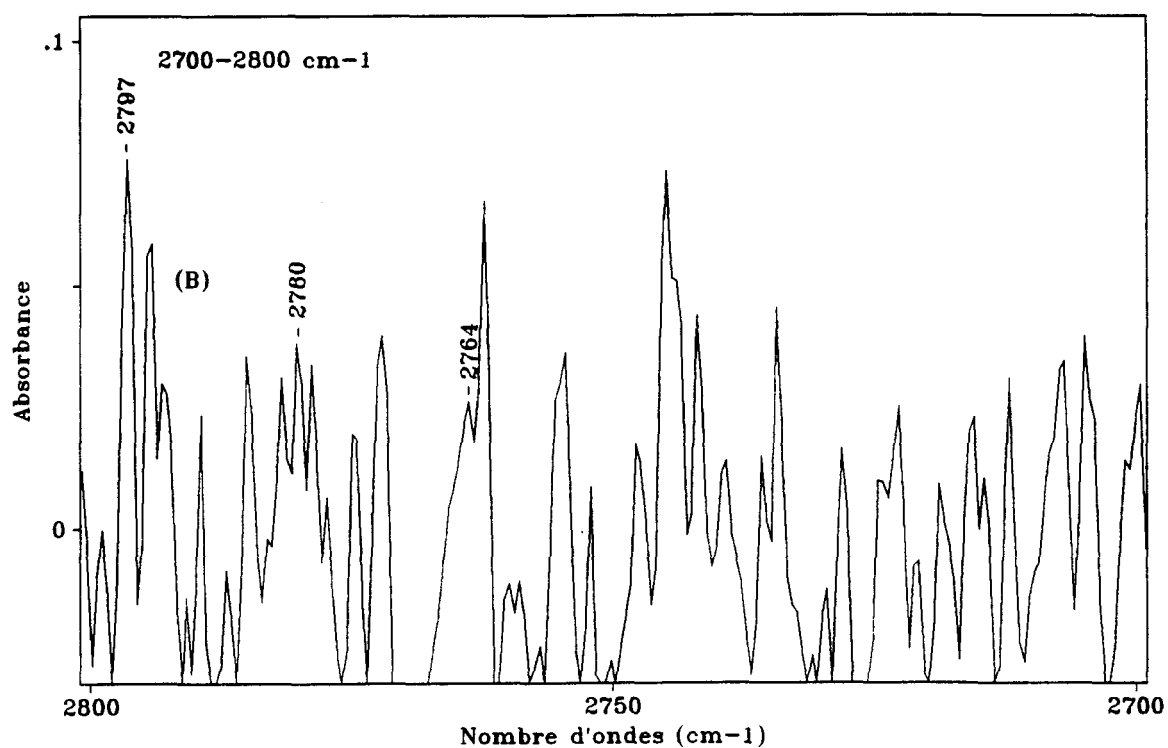
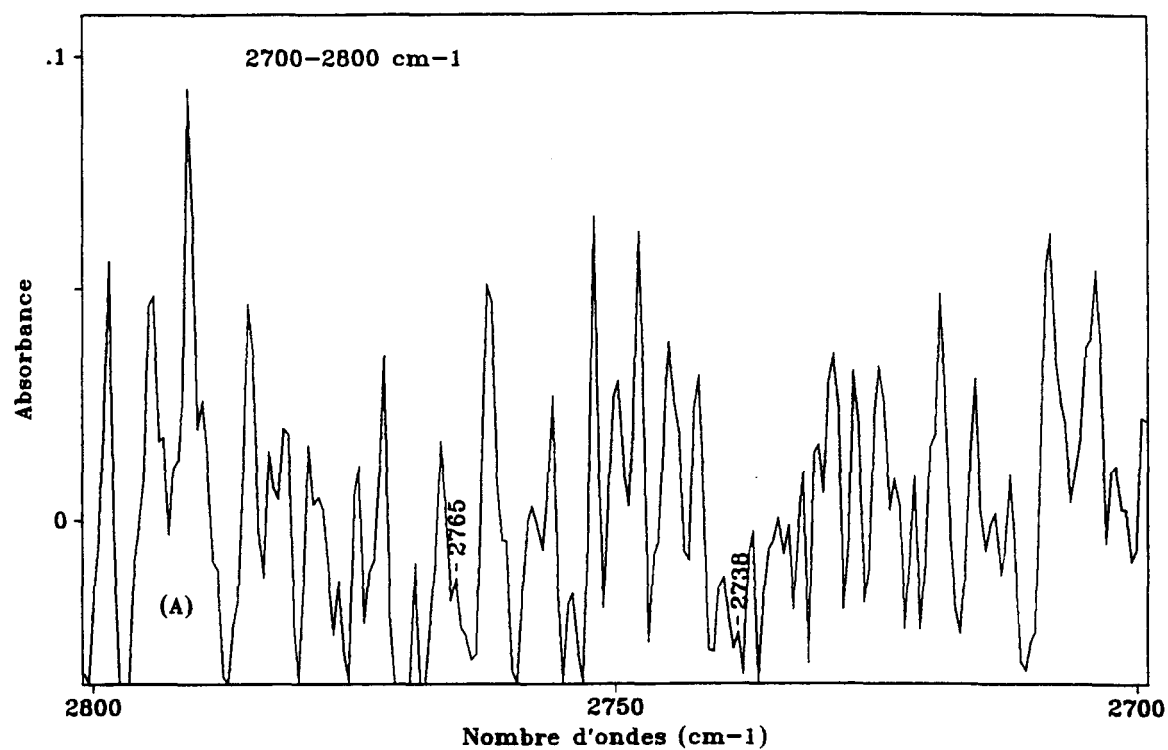


Figure 39. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 12 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800 cm<sup>-1</sup>.

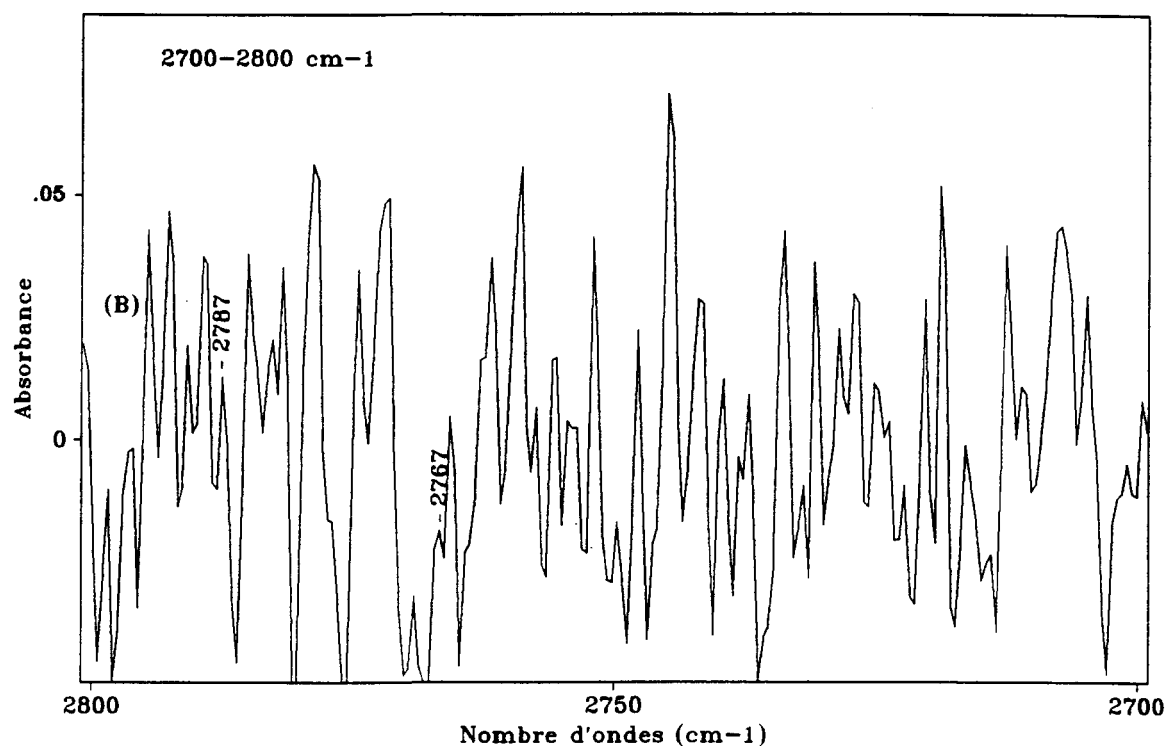
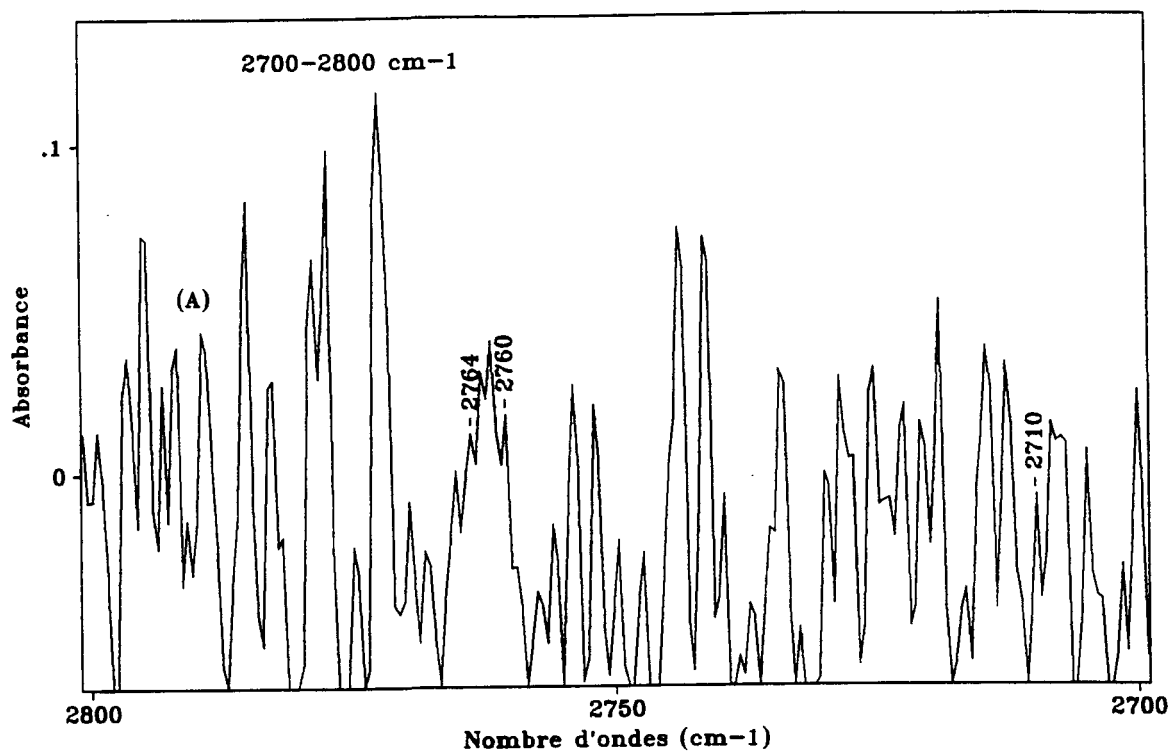


Figure 40. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 84 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

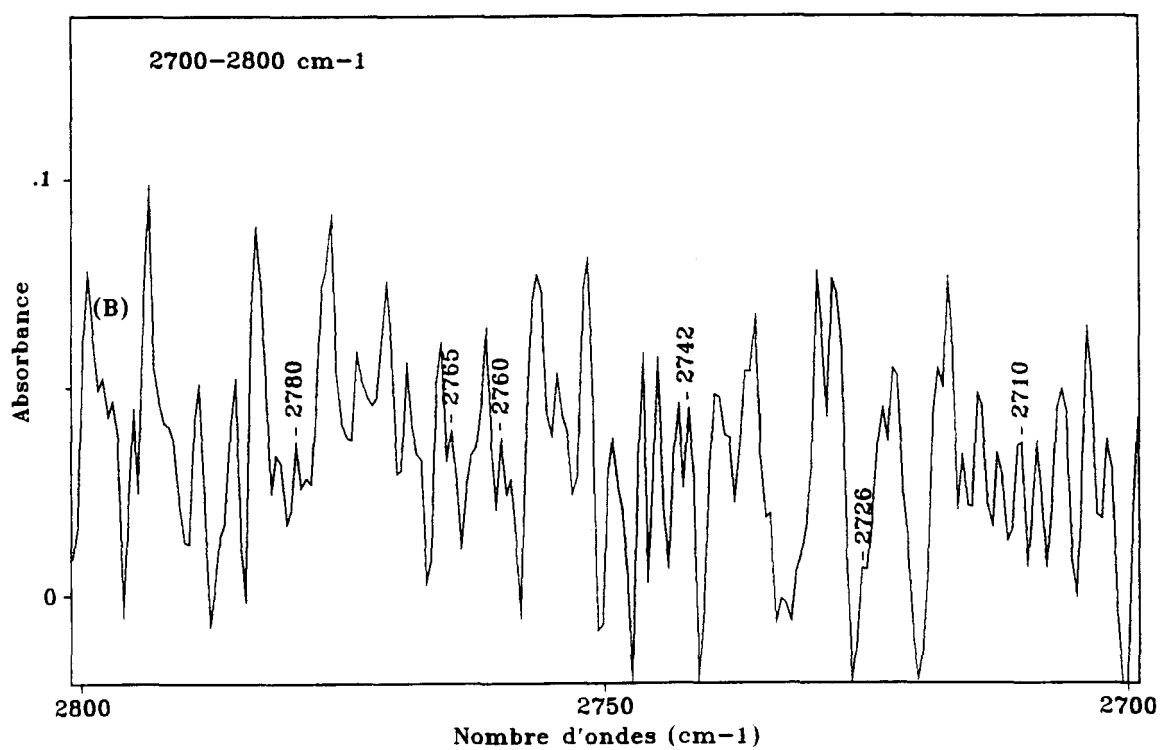
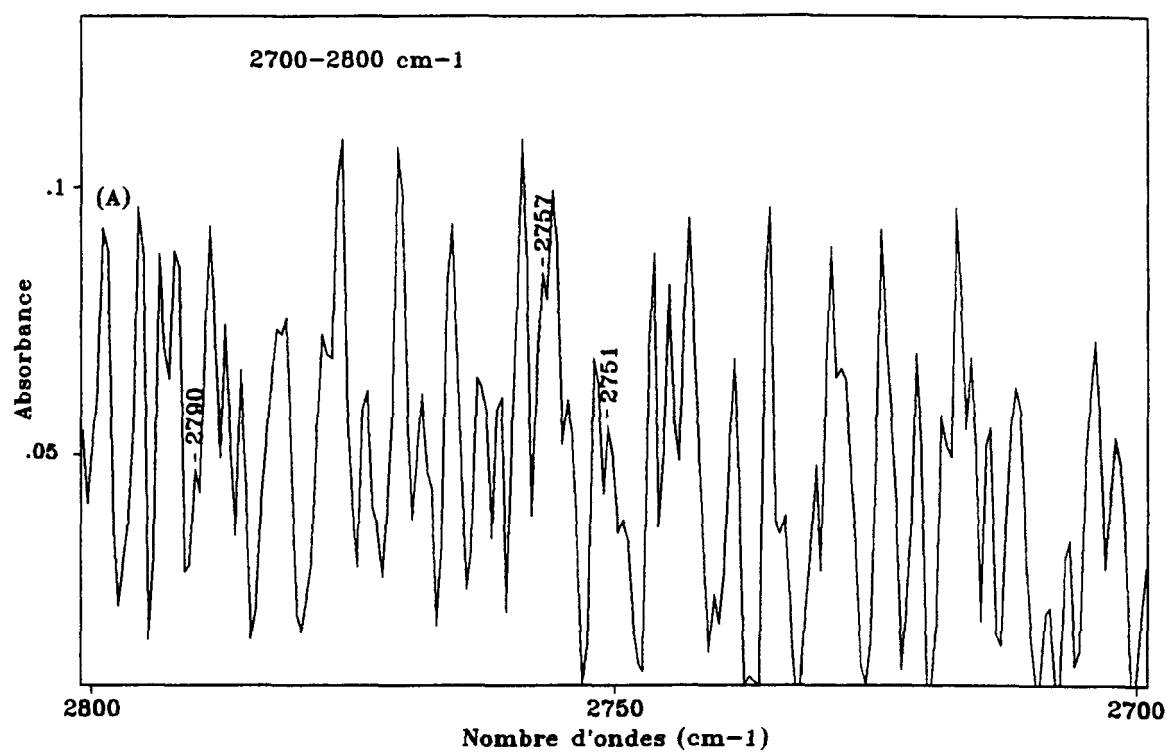


Figure 41. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 156 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

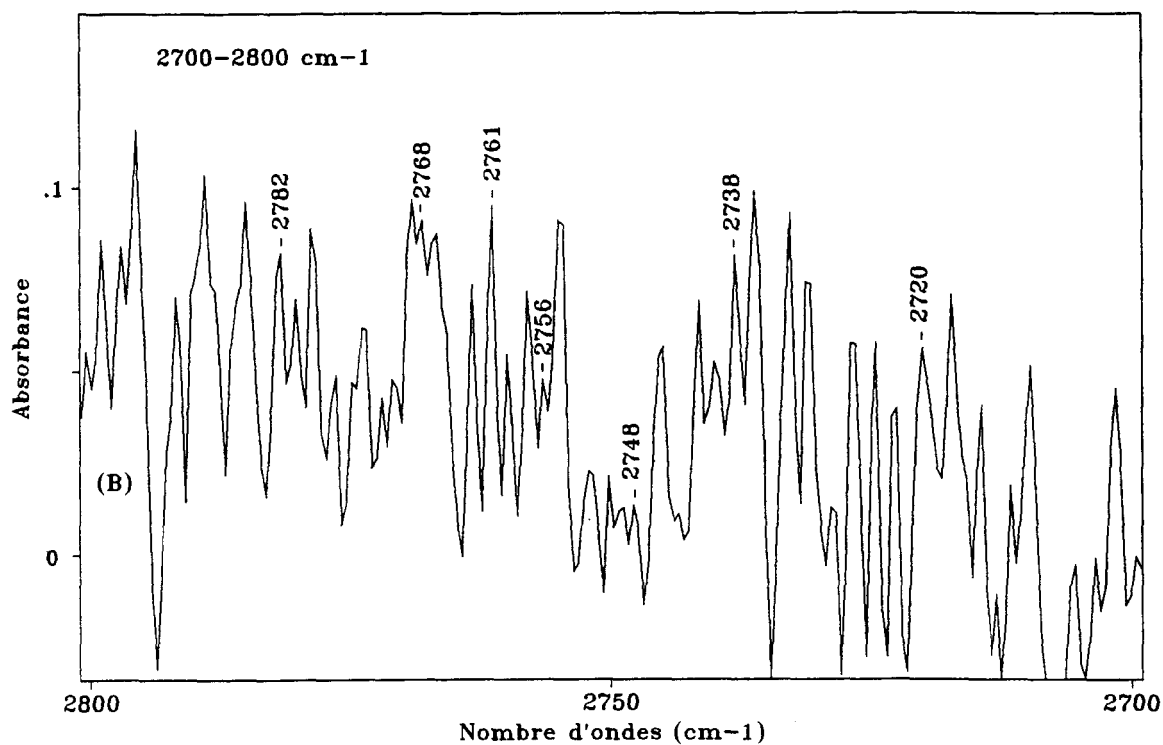
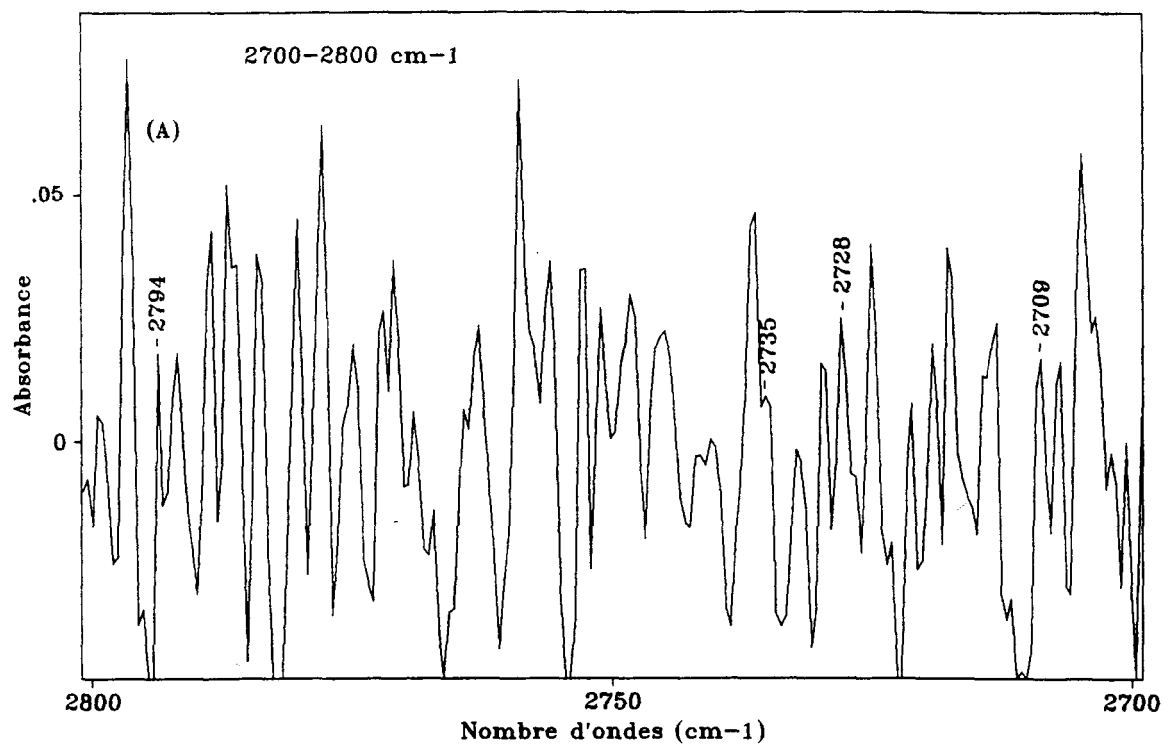


Figure 42. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 324 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

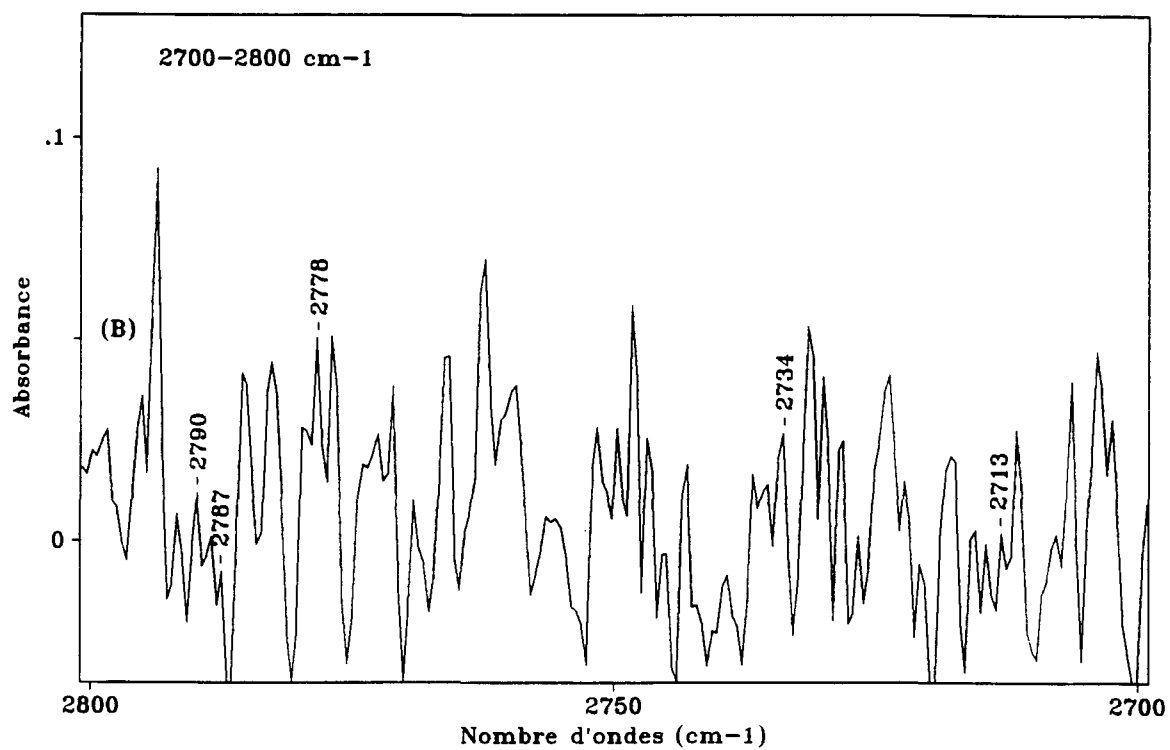
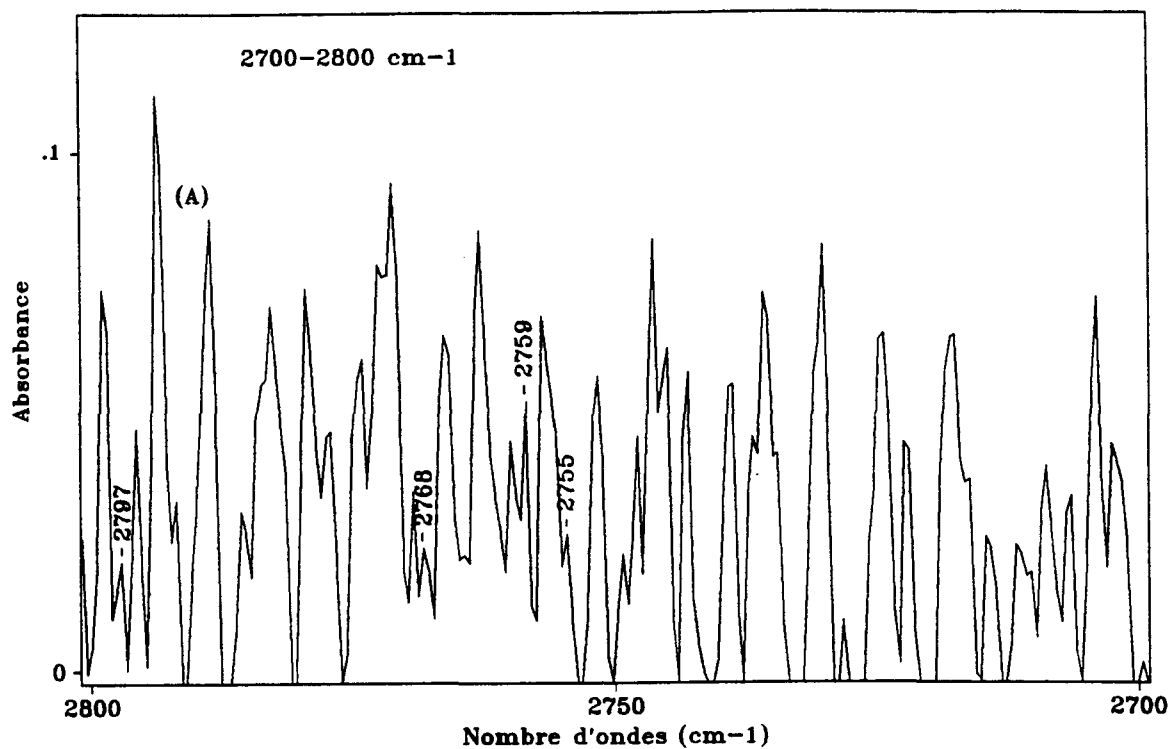


Figure 43. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 516 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région  $2700\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ .

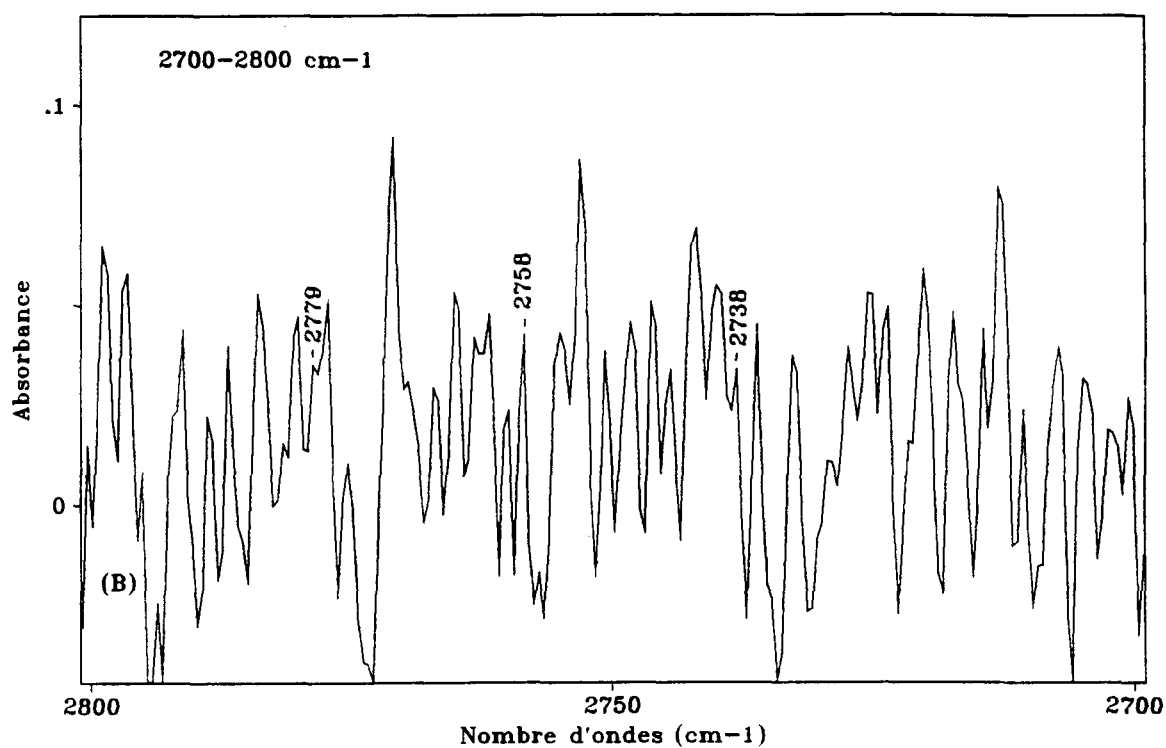
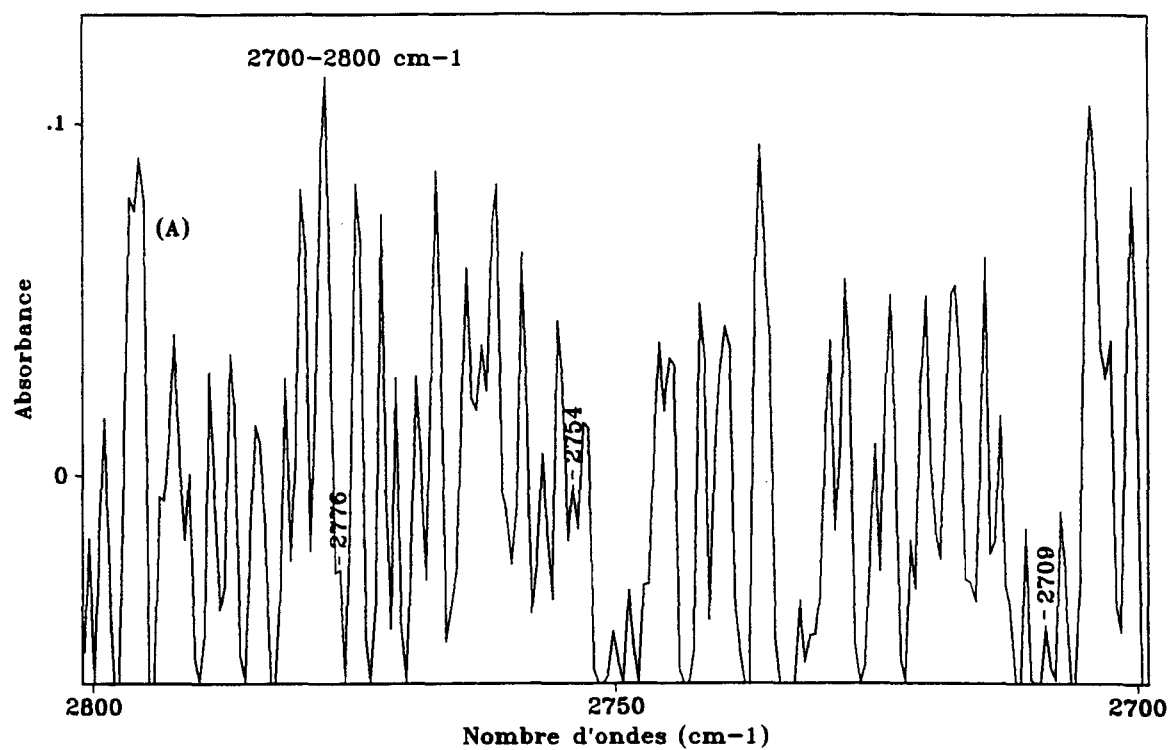


Figure 44. Spectres infrarouges des protéines de cellules de *Scenedesmus quadricauda* après 732 heures de culture: (A) sans cuivre; (B) en présence de 250 ppb de cuivre pour la région  $2700\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ .

Tableau VII. Pics disparus pour la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a
2738	0,006	2710	0,02			2709	0,02			2709	0,015
						2728	0,035				
						2735	0,003				
				2751	0,004			2755	0,004	2754	0,009
2765	0,008	2760	0,014	2757	0,005			2759	0,006		
		2764	0,009					2768	0,002		
										2776	0,014
				2790	0,003	2794	0,052	2797	0,004		

Tableau VIII. Nouveaux pics pour la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

Après 12 heures		Après 84 heures		Après 156 heures		Après 324 heures		Après 516 heures		Après 732 heures	
Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a	Nombre d'ondes en cm <sup>-1</sup>	Intensité en u.a
2764	0,011	2767	0,021	2710	0,003			2713	0,003		
				2726	0,003	2720	0,011				
				2742	0,005	2738	0,009	2734	0,006	2738	0,035
						2748	0,004				
				2760	0,005	2756	0,01			2758	0,019
2780	0,029	2787	0,037	2765	0,004	2761	0,016				
						2768	0,002				
				2780	0,009	2782	0,004	2778	0,006	2779	0,011
								2787	0,004		
								2790	0,005		
2797	0,011										



84 heures (Figure 40A), après 516 heures (Figure 43A) et après 732 heures (Figure 44A).

Nous considérons que tous les pics disparus cités ci-dessus peuvent correspondre aux vibrations de valence symétriques de  $\text{NH}_3^+$  (Rao, 1963; Avram et Mateescu, 1970). En effet, Rao (1963) a montré que cette région correspond aux vibrations de certains acides aminés et est étroitement liée aux vibrations du groupe  $\text{NH}_3^+$ . De même, Avram et Mateescu (1970) ont mis en évidence la faiblesse de l'intensité d'absorbance de la vibration du groupe  $\text{NH}_3^+$  et ils ont aussi remarqué que les vibrations du groupe  $\text{NH}_3^+$  sont très dépendantes de la structure de l'acide aminé.

Le tableau VIII présente quatre séries de nouveaux pics compris entre 2734 et 2742  $\text{cm}^{-1}$ , entre 2756 et 2760  $\text{cm}^{-1}$ , entre 2761 et 2767  $\text{cm}^{-1}$  et entre 2778 et 2782  $\text{cm}^{-1}$ . Les nouveaux pics à 2734, 2738, 2738 et 2742  $\text{cm}^{-1}$  ont été observés respectivement dans les spectres des échantillons expérimentaux après 516 heures (Figure 43B), après 324 heures (Figure 42B), après 732 heures (Figure 44B) et après 156 heures (Figure 41B); les nouveaux pics à 2756, 2758 et 2760  $\text{cm}^{-1}$  ont été enregistrés respectivement dans les spectres des échantillons expérimentaux après 324 heures (Figure 42B), après 732 heures (Figure 44B) et après 156 heures (Figure 41B); les pics à 2761, 2764, 2765 et 2767  $\text{cm}^{-1}$  ont été enregistrés respectivement dans les spectres des échantillons expérimentaux après 324 heures (Figure 42B), après 12 heures (Figure 39B), après 156 heures (Figure 41B) et après 84 heures (Figure 40B). Enfin, la dernière série de nouveaux pics à 2778, 2779, 2780, 2780 et 2782  $\text{cm}^{-1}$  ont été notés dans les spectres des échantillons expérimentaux après 516 heures (Figure 43B), après 732 heures (Figure 44B), après 12 heures (Figure 39B), après 156 heures (Figure 41B) et après 324 heures (Figure 42B). D'autres nouveaux pics à 2710, 2713, 2720 et 2726  $\text{cm}^{-1}$  ont été enregistrés respectivement dans les spectres des échantillons expérimentaux après 156

heures (Figure 41B), après 516 heures (Figure 43B), après 324 heures (Figure 42B) et après 156 heures (Figure 41B), de même ceux à 2748 et 2768  $\text{cm}^{-1}$  dans le spectre de l'échantillon expérimental après 324 heures (Figure 42B). D'après plusieurs études, ces pics ne peuvent correspondre qu'aux vibrations symétriques de valence du groupe  $\text{NH}_3^+$  (Rao, 1963; Avram et Mateescu, 1970). En effet, Avram et Mateescu (1970) ont spécifié dans leur ouvrage que les vibrations du groupe  $\text{NH}_3^+$  apparaissent dans la région 2530-2780  $\text{cm}^{-1}$ . De même, il est possible que la série de nouveaux pics compris entre 2734 et 2742  $\text{cm}^{-1}$  peut être issue du déplacement de la série de pics disparus compris entre 2751 et 2755  $\text{cm}^{-1}$  ou celle entre 2790 et 2797  $\text{cm}^{-1}$ , suite aux perturbations de la configuration des acides aminés provoquées par la présence de cuivre (Rao, 1963).

D'autre part, nous avons remarqué la présence d'autres nouveaux pics à 2787, 2787, 2790 et 2797  $\text{cm}^{-1}$  qui ont été enregistrés dans le spectre de l'échantillon expérimental après 84 heures (Figure 40B), après 516 heures (Figure 43B), après 516 heures (Figure 43B) et après 12 heures (Figure 39B). Nous pouvons associer à ces derniers pics les vibrations de la liaison CH dont la région d'absorbance est comprise entre 2900-3000  $\text{cm}^{-1}$  et qui a subi des grands déplacements suite aux associations entre les molécules d'acides aminés (Avram et Mateescu, 1970). La présence de nouveaux pics ou l'absence des pics dans la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$  est interprétée comme étant due à l'interaction du cuivre avec certains acides aminés par l'intermédiaire du groupe  $\text{NH}_3^+$ .

### 3.2.5 Analyse des résultats

En étudiant les spectres infrarouges de tous les échantillons des protéines de cellules de *S. quadricauda*, nous avons enregistré la présence de plusieurs nouveaux pics et la disparition

de certains pics dans la plupart des spectres infrarouges des échantillons expérimentaux. Tous ces pics ont été sélectionnés de telle façon que leur intensité soit supérieure au bruit de fond et à la répétabilité de l'appareil. Ces limites de sélection ont été calculées à l'aide de la loi normale centrée-réduite avec un risque d'erreur de 5 % (Voir Section 3.2).

Pour la région  $800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , nous remarquons que les nouveaux pics compris entre  $858$  et  $863\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits dans quatre échantillons expérimentaux sur six. Les nouveaux pics à  $835\text{ cm}^{-1}$  et entre  $851$  et  $855\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits dans trois échantillons expérimentaux sur six. Par contre, pour les pics disparus, nous avons enregistré seulement une série de pics entre  $828$  et  $832\text{ cm}^{-1}$  dans trois échantillons sur six. Nous pensons que ces pics qui se sont reproduits dans trois à quatre échantillons sur six peuvent fort bien être associés aux vibrations de la liaison NH du groupe  $\text{NH}_2$  complexé par le cuivre, comme l'a montré Rao (1963) par l'affinité de l'azote pour les métaux lourds comme le cuivre. Il faut mentionner que dans certains spectres des échantillons expérimentaux, nous n'avons pas réussi à observer de nouveaux pics, cela est peut-être dû à la bande d'absorbance de  $\text{CH}_2$  qui est assez intense et aurait pu masquer certaines vibrations du groupe  $\text{NH}_2$  (Avram et Mateescu, 1970).

Pour la région  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , nous avons observé la série de nouveaux pics compris entre  $1583$  et  $1589\text{ cm}^{-1}$  qui se sont reproduits dans presque tous les spectres infrarouges des échantillons expérimentaux seul le spectre de l'échantillon après 156 heures fait exception. De même, les nouveaux pics compris entre  $1557\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$  se sont reproduits dans trois spectres des échantillons expérimentaux sur six. L'existence de nouveaux pics dans cinq spectres des échantillons expérimentaux sur six nous permet d'affirmer que l'existence de ces pics n'est pas due au hasard. Cela supporte plutôt très fortement notre hypothèse à l'effet que la présence de cuivre a interagi avec les groupes  $\text{NH}_2$  (Avram et Mateescu, 1970). Cette

dernière série de nouveaux pics compris entre 1557 et 1560  $\text{cm}^{-1}$  peut être issue du déplacement de pics disparus compris entre 1565 et 1569  $\text{cm}^{-1}$ . Quoique chacune des deux séries de pics ait été observée dans seulement trois spectres des échantillons expérimentaux sur six, cela est peut-être dû aux grandes interférences provoquées par la bande d'absorbance de la molécule d'eau comprise entre 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  qui dans certains cas peut masquer certaines vibrations du groupe  $\text{NH}_2$  dans la région 1550-1600  $\text{cm}^{-1}$  (Avram et Mateescu, 1970). Il faut rappeler que ces derniers pics ont une intensité supérieure à l'intervalle de confiance des variations de bruit de fond et de la répétabilité. Ce critère permet de dire qu'il y a 95 % de probabilité que chacun de ces pics soit différent du bruit de fond ou qu'il ne soit pas relié à un problème de répétabilité spectrale. Nous pouvons donc supposer que l'existence de nouveaux pics est liée à la complexation de protéines par le cuivre à l'aide du groupe  $\text{NH}_2$  de certains acides aminés.

Pour la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$ , nous avons enregistré deux séries de pics disparus entre 1658-1660 et 1690-1696  $\text{cm}^{-1}$ . L'absence de ces dernières séries de pics a été enregistrée dans trois des six spectres. D'autre part, nous avons observé quatre séries de nouveaux pics compris entre 1656-1662, 1680-1685, 1683-1689 et 1715-1720  $\text{cm}^{-1}$ . L'apparition de ces nouveaux pics a été enregistrée dans quatre des six spectres pour chaque série de pics. Il faut remarquer que dans la plupart des cas, les spectres après 84 et après 156 heures ne participent à ces séries que par un pic pour chaque échantillon. Saint-Pierre (1993) a montré que la concentration du cuivre dans les cellules contaminées a diminué après avoir atteint un maximum entre le début de l'expérience et la 84<sup>ème</sup> heure. En spectroscopie infrarouge, nous ne pouvons pas associer l'absence de ces nouveaux pics uniquement à une diminution de la concentration des protéines. En effet, Zhang et *al.* (1992) ont suggéré que les variations de concentration supérieure à la concentration minimale détectable n'ont aucun effet sur les

nombres d'ondes des molécules dans une étude qualitative en spectroscopie infrarouge. Aussi, Saint-Pierre (1993) a mentionné dans son travail que le pH varie entre 6 et 7,6 mais ces deux valeurs extrêmes ont été enregistrées entre la 80<sup>ème</sup> et la 140<sup>ème</sup> heure. Nous pouvons supposer que cette variation de pH ait un lien avec la rareté de nouveaux pics dans les spectres des échantillons expérimentaux après 84 heures et après 156 heures, surtout dans les deux séries de pics compris entre 1680-1685  $\text{cm}^{-1}$  et entre 1683-1689  $\text{cm}^{-1}$ . Il est possible que des modifications de la structure ionique de la protéine aient entraîné une diminution de l'affinité des fonctions amides envers les ions cuivriques. Malgré cela, nous supposons qu'il y ait eu complexation des groupes CO des fonctions amides avec le cuivre puisque la présence de nouveaux pics a été enregistrée dans quatre spectres des échantillons expérimentaux sur six.

Pour la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ , nous avons enregistré quatre séries de pics disparus dont la plupart se situent dans trois des six spectres. Il en est de même pour les nouveaux pics où nous avons noté la présence de quatre séries de nouveaux pics dont la plupart se sont reproduits dans quatre des six spectres. La série de nouveaux pics compris entre 2778- 2782  $\text{cm}^{-1}$  ont fait exception suite à une présence dans cinq spectres sur six. Il faut mentionner que le spectre de l'échantillon expérimental après 84 heures n'a pas présenté un nouveau pic dans cette dernière série, ce qui appuie l'hypothèse avancée précédemment à propos de l'influence de la diminution du pH. Comme la présence de nouveaux pics a été enregistrée dans quatre à cinq spectres sur une possibilité de six, nous pouvons alors associer à ces pics, les vibrations du groupe  $\text{NH}_3^+$  qui ont été perturbées ou déplacées suite à la complexation du cuivre avec les protéines.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Les spectres infrarouges des échantillons expérimentaux provenant d'un milieu avec 250 ppb de cuivre ont présenté des nouveaux pics dans les régions spectrales de 800-900, 1500-1600, 1650-1750 et 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$ . En effet, les résultats ont montré l'existence de treize nouveaux pics qui se reproduisent dans trois à cinq spectres des échantillons expérimentaux sur six.

Pour la région 800-900  $\text{cm}^{-1}$ , les spectres infrarouges des échantillons expérimentaux ont présenté trois nouveaux pics à 835, 851-855 et 861-868  $\text{cm}^{-1}$ . Ces nouveaux pics peuvent correspondre à la vibration du groupe  $\text{NH}_2$  ayant interagi avec le cuivre. La région 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  présente deux nouveaux pics à 1557-1560  $\text{cm}^{-1}$  et 1583-1587  $\text{cm}^{-1}$ . Ces deux pics correspondent aux vibrations du groupe  $\text{NH}_2$  de la bande amide II.

De même, la région 1650-1750  $\text{cm}^{-1}$  a enregistré la présence de quatre autres nouveaux pics à 1656-1662, 1680-1685, 1683-1689 et 1715-1720  $\text{cm}^{-1}$ . Cette région correspond à la bande amide I caractérisée par la vibration de la liaison CO du groupe CONH. Ceci nous amène à supposer que ces nouveaux pics correspondent aux vibrations de la liaison CO de la bande amide I suite à une complexation avec le cuivre. Enfin, la région 2700-2800  $\text{cm}^{-1}$  présente aussi quatre nouveaux pics à 2738-2742, 2756-2760, 2761-2767 et 2778-2782  $\text{cm}^{-1}$  qui peuvent être associés au groupe  $\text{NH}_3^+$ . Il faut mentionner que la variation de pH

enregistrée au cours de l'expérience entre la 80<sup>ème</sup> et la 140<sup>ème</sup> heure pourrait être reliée à l'absence des nouveaux pics dans les spectres des échantillons expérimentaux après 84 heures et après 156 heures.

Nos résultats démontrent donc que les nouveaux pics des spectres infrarouges des échantillons expérimentaux sont associés à certaines fonctions amides. L'implication du groupe SH dans la complexation de la protéine avec le cuivre n'a pas été mise en évidence puisque les vibrations de la liaison SH ont présenté une trop faible intensité. L'étude qualitative par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier nous a permis de montrer l'interaction du cuivre sur les fonctions amides,  $\text{NH}_2$ , CO et  $\text{NH}_3^+$  des protéines.



## RÉFÉRENCES

- Avram, M. & G.H.D.Mateescu. 1970. Spectroscopie infrarouge . Editions Dunod. Paris. 642 pp.
- Bastien, C. 1986. Effets du cuivre sur l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* et *Chlorella vulgaris* en relation avec l'acquisition de tolérance. Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en productivité aquatique. 66 pp.
- Brischwein, M., B. Scharf, M. Engelhard & W. Mäntele. 1993. Analysis of the Redox Reaction of an Archaeobacterial Copper Protein, Halocyanin, by Electrochemistry and FTIR Difference Spectroscopy. *Biochem.*, 32 : 13710-13717.
- Dave, B.C., J.P. Germanas & R.S. Czernuszewicz. 1993. Coordination chemistry of manganese with 2,2 bipyridine: Synthetic access to high valent polynuclear oxomanganese complexes of biological relevance. *New. J. of Chem.*, 18 : 149-153.
- De Vos, C.H.R., M.J. Vonk, R. Vooijs & H. Schat. 1992. Glutathione depletion due to copper induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene Cucubalus*. *J. Am. Chem. Soc.*, 98 : 853-858.
- Determann, H. 1969. Chromatographie sur gel. Editions Masson. Paris. 193 pp.
- Ernst, W. H. O. 1975. Physiology of heavy metal resistance in plants. International conference on heavy metals in environment. pp. 121-136. CEP Consultants, Toronto.
- Fernandes, J.C. & F.S. Henriques. 1991. Biochemical, Physiological and Structural effects of excess copper in plants. *The Bot. Rev.*, 57 : 247-273.
- Fischer, W.B., H.H Eysel, O.F. Nielsen & J.E. Bertie. 1994. Corrections to the the Baseline Distortions in the OH-Stretch Region of Aqueous Solutions. *Appl. Spect.*, 48 : 107-112.
- Ganter, U.M., T. Kashima, M. Sheves & F.Siebert. 1991. FTIR Evidence of an Altered Chromophore-Protein Interaction in the Artificial Visual Pigment cis-5,6-Dihydroisorhodopsin and Its Photoproducts BSI, Lumirhodopsin and Metarhodopsin-I. *J. Am. Chem. Soc.*, 113 : 4087-4092.
- Grill, E., W. Gekeler, E.L. Winnacker & M.H. Zenk. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.*, 150 : 197-202.

- Harmens, H., P.R. Den Hartog, W.M. Ten Bookum & J.A.C Verkleij. 1993. Increased Zinc Tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke Is Not Due to Increased Production of Phytochelatins. *Plant. Physiol.*, 103 : 1305-1309.
- Hildebrandt, P., J. Matysik, B. Schrader, B. Scharf & M. Engelhard. 1994. Raman Spectroscopic Study of the Blue Copper Protein Halocyanin from *Natronobacterium pharaonis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 33 : 11426-11431.
- Jackson, M. & M.H. Mantsch. 1995. The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Rev. in Biochem. and Molec. Biol.*, 30 (2) : 95-120.
- Jakobsen, J.R. & F.M. Wasacz. 1990. Infrared Spectra-Structure Correlations And Adsorption Behavior for Helix Proteins. *Appl. Spect.*, 44 : 1478-1490.
- Johnston, C.T., G. Sposito & C. Erickson. 1992. Vibrational Probe Studies of Water Interactions with Montmorillonite. *The Clay Min. Soc.*, 40 : 722-730.
- Nestor, L., J.A. Larrabee, G. Woolery, B. Reinhammar & T.G. Spiro. 1984. *Biochemistry*, 23 : 1084-1093.
- Plocke, D.J. & J.H.R. Kägi. 1992. Spectral characteristics of Cadmium-containing phytochelatin complexes isolated from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.*, 207 : 201-205.
- Rao, C.N.R. 1963. *Chemical Applications of Infrared Spectroscopy*. Academic Press. New York, NY. London. 681 pp.
- Reddy, G.N. & M.N.V. Prasad. 1991. Characterization of Cadmium Binding Protein from *Scenedesmus quadricauda* and Cd Toxicity Reversal by Phytochelatin Constituting Amino Acids and Citrate. *J. Plant Physiol.*, 140 : 156-162.
- Remsen, E.E. & J.J. Freeman. 1991. A Size-Exclusion Chromatography / FT-IR (SEC/FT-IR) Technique for Improved FTIR Spectroscopy of Proteins in D<sub>2</sub>O Solution. *Appl. Spect.*, 45 : 868-873.
- Russel, J.D. 1965. Infrared spectroscopy study of the dehydration of montmorillonite and saponite. *Clay Min. Bull.*, 5 : 443-464.
- Saint-Pierre, E. 1993. Mise en évidence d'un mécanisme de tolérance chez *Scenedesmus quadricauda* suite à une intoxication à long terme au cuivre. Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. 73 pp.

- Salisbury, F.B. & C.W. Ross. 1985. Plant Physiology, Third edition. Wadworth Publishing Company. Belmont, California. 540 pp.
- Solomon, E.I., M.J. Baldwin & M.D. Lowery. 1992. Axial ligand bonding in blue Copper proteins. *Inorg. Chim. Acta.*, 198 - 233.
- Speiser, D.M., S.L. Abrahamson, G. Banuelos & W.O. David. 1992. *Brassica juncea* Produces a Phytochelatin-Cadmium-Sulfide Complex. *Plant Physiol.*, 99 : 817-821.
- Stokes, P. M., T. Maler & J. R. Riordan. 1977. A low molecular weight copper binding protein in a copper tolerant strain of *Scenedesmus acutiformis*. Trace substance in environmental health. Vol. XI. University of Missouri Press, Columbia. pp. 146-154.
- Strand, S.W. & R.J. Jakobsen. 1991. The application of FTIR Spectroscopy to the study of proteins in solution. *J. Am. Lab.*, May : 28-31.
- Sykes, A.G. 1991. Mechanism of the reaction of colloidal decaaquatetra-sulfidoro-niobium (4+) with dioxygen. *Adv. Inorg. Chem.*, 36 : 377-408.
- Tukendorf, A. & W.E. Rauser. 1990. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to Cadmium. *Plant Sci.*, 70 : 155-166.
- Turner, R. G. & C. Marshall. 1972. The accumulation of Zinc by subcellular fractions of roots of *Agrostis tenuis* in relation to Zinc tolerance. *New Phytol.*, 71 : 671-677.
- Wagner, G. J. & R. M. Krotz. 1989. Perspectives on Cd and Zn accumulation, accommodation and tolerance in plant cells. *Metal ion homeostasis : Molec. Biol. and Chem.* pp. 325-336.
- Woodruff, W.H., K.A. Norton, B.I. Swanson & H.A. Fry. 1984. Time Resolved Resonance Raman Spectroscopy (TR<sup>3</sup>). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81 : 1263-1267.
- Zhang, Y.P., R.N.A. Lewis, R.S. Hodges & R.N. Mc Elhaney. 1992. Interaction of a Peptide Model of a Hydrophobic Transmembrane  $\alpha$ -Helical Segment of a Membrane Protein with Phosphatidylcholine Bilayers : Differential Scanning Calorimetric and FTIR Spectroscopic Studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 114 : 11579-11588.