

Université de Montréal

**Association des protéines du liquide séminal bovin aux membranes
lipidiques par titrage calorimétrique isotherme, microscopie de
fluorescence et la technique des monocouches**

par
Lesley Courtemanche

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Chimie

Novembre, 2006

© Lesley Courtemanche, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Association des protéines du liquide séminal bovin aux membranes
lipidiques par titrage calorimétrique isotherme, microscopie de
fluorescence et la technique des monocouches**

Présenté par :
Lesley Courtemanche

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Suzanne Giasson

Président-rapporteur

Michel Lafleur

Directeur de recherche

Puttaswamy Manjunath

Codirecteur de recherche

Antonella Badia

Membre du jury

Résumé

Les protéines contenues dans le liquide séminal bovin, les protéines BSP, interagissent avec les membranes des spermatozoïdes et contribuent à leur capacitation. L'objectif de cette étude était de caractériser la nature de ces interactions et les paramètres qui les influencent. Le titrage calorimétrique isotherme a permis de démontrer que la liaison de la protéine dépend des propriétés physico-chimiques des membranes. Effectivement, la présence de phosphatidyléthanolamine (30% mol/mol) dans les membranes de phosphatidylcholine augmente l'affinité de la protéine, alors que la même proportion de cholestérol l'amoinde. Puisque la protéine n'interagit pas directement avec le cholestérol et la phosphatidyléthanolamine, on conclut que la rigidité et l'empilement des chaînes ont un impact sur l'association de la protéine. La microscopie de fluorescence a permis d'observer des changements morphologiques des membranes lorsque la protéine s'y lie. Cette technique se veut très prometteuse afin d'observer des modifications morphologiques *in situ* et en temps réel. Il a été démontré que la protéine induit la transformation des vésicules en colliers, en tubes et en de plus petites vésicules (diamètre ~ 100 nm). Ces déformations sont typiques d'une augmentation de l'aire du feuillet externe par rapport au feuillet interne. Ceci pourrait être causé par l'association de la protéine au feuillet externe. Cette hypothèse a été confirmée pour un mélange de phosphatidylcholine et de cholestérol (7/3 mol/mol), en utilisant la technique des monocouches. Cependant, une diminution de l'aire a été observée pour une monocouche de phosphatidylcholine pure. Ceci indique que les changements morphologiques observés ne s'expliquent pas simplement par un débalancement des aires des monocouches. Il est possible que la présence des deux feuillets de la bicouche soit nécessaire pour bien reproduire les interactions.

Mots-clés :

Membrane, Protéine BSP-A1/A2, Titrage calorimétrique isotherme (ITC), Microscopie, Monocouche, Langmuir.

Abstract

BSP Proteins are found in the seminal fluid and they interact with sperm membranes in order to induce capacitation. The goal of this study was to investigate the nature of this interaction as well as the parameters that affect it. Isothermal titration calorimetry was used to prove that the membrane's physicochemical properties influence the adsorption of the protein. The presence of phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine membranes (30% mol/mol) increased the affinity of the protein, whereas the same proportion of cholesterol decreased it. Because the protein does not interact directly with cholesterol or with phosphatidylethanolamine, membrane rigidity and packing were found to have an impact on the way the protein adsorbs. When it does so, the protein induces changes in membrane morphology that were observed by fluorescence microscopy. This technique is very promising for the real-time observation of morphological changes *in situ*. An increase in the area of the external leaflet of the bilayer explains the membrane deformations induced by the protein. This could be due to the binding of the protein to this leaflet. Using the Langmuir monolayer technique, this hypothesis was corroborated for a mix of phosphatidylcholine and cholesterol (7/3; mol/mol). However, the area of the monolayer was found to decrease for pure phosphatidylcholine. This indicates that the morphological changes are not simply caused by an area imbalance between the internal and external leaflets. It is likely that both leaflets are required to reproduce the protein/lipid interaction.

Keywords :

Membrane, BSP-A1/A2 Protein, Isothermal titration calorimetry (ITC),
Microscopy, Monolayer, Langmuir.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 <i>Protéines BSP</i>	1
1.2 <i>Membranes des spermatozoïdes</i>	4
1.3 <i>Interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides</i>	10
1.4 <i>Titration calorimétrique isotherme (ITC)</i>	21
1.4.1 <i>La technique</i>	21
1.4.2 <i>Modèle de partage</i>	24
1.4.3 <i>Modèle de Seelig (Gouy-Chapman)</i>	26
1.4.4 <i>Modèle de Scatchard</i>	28
1.5 <i>Microscopie de fluorescence</i>	29
1.6 <i>Monocouches de Langmuir</i>	30
1.6.1 <i>Pression de surface (Π)</i>	30
1.6.2 <i>Le bain Langmuir</i>	31
1.6.3 <i>Isotherme de compression (Π-A)</i>	32
1.6.4 <i>A ou Π constante (Π-t ou A-t)</i>	35
1.7 <i>Problématique</i>	36
Chapitre 2 : Étude calorimétrique des interactions entre la BSP-A1/A2 et les membranes lipidiques	39
2.1 <i>Introduction</i>	39
2.2 <i>Matériel et méthodes</i>	39
2.2.1 <i>Matériel</i>	39

2.2.2	<i>Préparation des LUV</i>	40
2.2.3	<i>Paramètres ITC</i>	40
2.3	<i>Résultats</i>	41
2.3.1	<i>Interaction entre la BSP-A1/A2 et les membranes de POPC</i>	41
2.3.2	<i>Effet de la tête polaire</i>	49
2.3.3	<i>Effet du cholestérol</i>	51
2.3.4	<i>Interaction entre la BSP-A1/A2 et les substrats solubles</i>	51
2.4	<i>Discussion</i>	55
2.4.1	<i>Interactions entre la BSP-A1/A2 et les membranes</i>	55
2.4.2	<i>Interactions entre la BSP-A1/A2 et les substrats solubles</i>	60
2.4.3	<i>Conclusions</i>	62
Chapitre 3 : Étude des modifications morphologiques des membranes lipidiques induites par la BSP-A1/A2 par microscopie de fluorescence		63
3.1	<i>Introduction</i>	63
3.2	<i>Matériel et méthodes</i>	63
3.2.1	<i>Matériel</i>	63
3.2.2	<i>Préparation des MLV</i>	64
3.2.3	<i>Microscopie de fluorescence</i>	64
3.2.4	<i>Diffusion de la lumière</i>	65
3.3	<i>Résultats</i>	65
3.3.1	<i>MLV de POPC et de POPC/Chol</i>	65
3.3.2	<i>Effet de la BSP-A1/A2 sur la forme des membranes de POPC</i>	66
3.3.3	<i>Diffusion de la lumière</i>	70
3.4	<i>Discussion</i>	71
Chapitre 4 : Étude des interactions entre la BSP-A1/A2 et les monocouches lipidiques		76
4.1	<i>Introduction</i>	76
4.2	<i>Matériel et méthodes</i>	76
4.2.1	<i>Matériel</i>	76
4.2.2	<i>Préparation des solutions</i>	77
4.2.3	<i>Le bain de Langmuir</i>	77
4.2.4	<i>Isothermes de compression de POPC</i>	78
4.2.5	<i>Adsorption de la BSP-A1/A2 à l'interface air-eau</i>	78

4.2.6	<i>Interaction entre la BSP-A1/A2 et une monocouche.....</i>	79
4.3	<i>Résultats</i>	79
4.3.1	<i>Isotherme de compression de monocouches lipidiques.....</i>	79
4.3.2	<i>Cinétique de l'adsorption de la BSP-A1/A2 à l'interface air-eau</i>	81
4.3.3	<i>Interaction de la BSP-A1/A2 avec les monocouches lipidiques.....</i>	83
4.4	<i>Discussion</i>	86
Chapitre 5 : Conclusion générale.....		92
Bibliographie.....		94

Liste des tableaux

- Tableau I** : Composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes bovins. 7
- Tableau II** : Description des chaînes apolaires (R_1 et R_2) des phosphatidylcholines qui forment la membrane plasmique des spermatozoïdes bovins. 9
- Tableau III** : Enthalpie molaire de liaison et saturation de la membrane pour l'association de la BSP-A1/A2 aux différents systèmes lipidiques à 37 °C... 45
- Tableau IV** : Constantes de partage et charges effectives de la protéine selon le modèle de partition corrigé de Gouy-Chapman pour l'association de la BSP-A1/A2 aux différents systèmes lipidiques à 37 °C. 47
- Tableau V** : Constantes d'affinité et nombres de lipides par protéine selon le modèle de Scatchard pour l'association de la BSP-A1/A2 aux différents systèmes lipidiques à 37 °C. 48

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure primaire de la BSP-A1/A2.	2
Figure 1.2 : Indices d'hydrophobicité, évalué selon la méthode de Kyte & Doolittle, des acides aminés de la BSP-A1/A2.	3
Figure 1.3 : Représentation schématique d'un spermatozoïde.	4
Figure 1.4 : Structures des phospholipides utilisés pour former les membranes modèles.	8
Figure 1.5 : Transition de phase d'une bicouche phospholipidique.	10
Figure 1.6 : Mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins par les protéines du liquide séminal bovin.	12
Figure 1.7 : Modification de la morphologie de vésicules (MLV) de phosphocholine par la BSP-A1/A2.	20
Figure 1.8 : Exemple de titrage isotherme visant à déterminer l'enthalpie.	22
Figure 1.9 : Structure du phospholipide fluorescent utilisé pour marquer les membranes modèles de POPC.	29
Figure 1.10 : Schéma du bain de Langmuir.	32
Figure 1.11 : Schéma d'un isotherme de compression (Π -A) et les phases d'une monocouche de phospholipide.	33
Figure 1.12 : Schéma d'un isotherme de compression et les informations qu'il fournit.	35
Figure 2.1 : Allure typique d'une expérience ITC, en excès de lipides, permettant de déterminer l'enthalpie molaire de liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C.	42
Figure 2.2 : Courbe de titrage ITC typique pour la liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C. La section supérieure montre la variation de chaleur correspondant à chaque injection (40 μ L) de la solution de protéine (0,2 mM) à la suspension de lipides (0,53 mM). La section inférieure indique l'enthalpie totale calculée.	43
Figure 2.3 : Effet de Z_p sur l'isotherme décrivant la liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C.	44

Figure 2.4 : Effet de Z_p sur le modèle de Gouy-Chapman pour l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les LUV de POPC à 37 °C.....	46
Figure 2.5 : Isotherme de Scatchard décrivant la liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C.	48
Figure 2.6 : Titrages et isothermes décrivant l'association de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC/POPE (7/3) et aux LUV de POPC/POPG (7/3) à 37 °C.....	50
Figure 2.7 : Titrage et Isothermes décrivant l'interaction entre la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC/Chol (7/3) à 37 °C.....	52
Figure 2.8 : Allure typique d'une expérience ITC permettant de déterminer l'enthalpie molaire de liaison de la BSP-A1/A2 à la phosphocholine à 37 °C.	53
Figure 2.9 : Courbe de titrage ITC typique pour la liaison de la BSP-A1/A2 à la phosphocholine à 37 °C.....	54
Figure 3.1 : Micrographe de MLV de POPC (contenant 0,01% mol/mol de β -BODIPY @ 500/510 C ₁₂ -HPC).....	66
Figure 3.2 : Modifications morphologiques des MLV de POPC induites par la BSP-A1/A2 (ratio PC/BSP = 24).	68
Figure 3.3 : Transformation d'un collier en long tube fin.....	69
Figure 3.4 : Progression des quantités relatives de grosses et de petites particules dans la suspension de MLV de POPC en présence de la BSP-A1/A2.....	70
Figure 3.5 : Ordre des transitions morphologiques induites par la BSP-A1/A2 proposé suite aux observations en microscopie de fluorescence.	72
Figure 3.6 : Diagramme des morphologies prédites des vésicules.	74
Figure 4.1 : Isotherme de compression d'une monocouche de POPC.....	80
Figure 4.2 : Adsorption de la BSP-A1/A2 à l'interface air-eau.	82
Figure 4.3 : Variation de l'aire occupée par une monocouche de POPC en contact avec une sous-phase contenant la BSP-A1/A2.....	84
Figure 4.4 : Variation de l'aire occupée par une monocouche de POPC/Chol (7/3) en contact avec une sous-phase contenant la BSP-A1/A2.	85

Liste des abréviations

% (mol/mol) : Pourcentage molaire
 % (w/w) : Pourcentage massique
 °C : degré Celsius
 χ^2 : Test statistique du khi carré
 Δa_o : Paramètre indiquant la différence d'aire entre les feuillets externe et interne
 ΔG_{int} : Énergie libre de Gibbs des interactions de courte portée
 ΔG_{long} : Énergie libre de Gibbs des interactions de longue portée
 ΔG_{tot} : Énergie libre de Gibbs totale
 Δh_i : Enthalpie partielle correspondant à l'injection « i »
 ΔH_{mot} : Enthalpie molaire de réaction
 ϵ_o : Permittivité du vide
 ϵ_r : Permittivité relative du milieu (l'eau)
 ϕ_o : Potentiel de surface
 γ_o : Tension superficielle de l'eau à 25 °C et à une pression de 1 atmosphère
 γ : Tension superficielle d'un film à l'interface air-eau
 Π : Pression de surface
 Π_c : Pression de rupture
 σ : Densité de charge
 Å : Angstrom (10^{-10} mètre)
 A : Aire de l'interface
 A_{ext} : Aire du feuillet externe
 A_{int} : Aire du feuillet interne
 A_L : Aire occupée par un phospholipide
 A_{lim} : Aire moléculaire limite
 A_{norm} : Aire de la surface normalisée par rapport à l'aire initiale de la surface
 Arg : Arginine
 BSP : Bovine seminal plasma
 $C_{BSP, s}$: Concentration de protéines dans la seringue
 C_{eau} : Concentration de l'eau
 $Chol$: Cholestérol
 C_i : Concentration de la composante « i »
 C_L : Concentration de lipide dans la cellule
 C_M : Concentration de protéines libres à proximité de la membrane
 DLS : Dynamic light scattering
 $DMPC$: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
 e : Charge élémentaire
 $EDTA$: Acide éthylènediamine-tétraacétique
 F_o : Constante de Faraday
 Fn : Fibronectine
 g : Gramme
 G : Phase gazeuse
 GUV : Giant unilamellar vesicle
 HDL : High density lipoprotein
 ITC : Isothermal titration calorimetry

J : Joule
 K : Constante d'affinité selon le modèle de Scatchard
 K_p : Constante de partage
 K_p^{int} : Constante de partage interfacial
 K_{tot} : Constante de partage des interactions de courte et de longue portées
 L : Litre
 LC : Phase liquide condensé
 LE : Phase liquide étendu
 LUV : Large unilamellar vesicle
 Lys : Lysine
 m : Mètre
 M : Concentration molaire (moles/litre)
 MLV: Multilamellar vesicle
 Mol : Mole
 MOPS : Acide 3-morpholinopropanesulfonique
 N : Newton
 n_L : Nombre de lipides
 $n_{L/P}$: Nombre de lipides par protéine liée
 $n_{P,b}$: Nombre de protéines liées
 o-PC : Ortho-phosphorylcholine
 PC : Phosphatidylcholine
 PE : Phosphatidyléthanolamine
 POPC : 1-Palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
 POPE : 1-Palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine
 POPG : 1-Palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-[phospho-*rac*-(1-glycérol)]
 PS : Phosphatidylsérine
 R : Constante des gaz
 RPE : Résonance paramagnétique électronique
 s : Secondes
 SC : Phase solide condensé
 SM : Sphingomyéline
 SPR : Surface plasmon resonance
 SUV : Small unilamellar vesicles
 T : Température
 Trp : Tryptophane
 Tyr : Tyrosine
 v : Paramètre indiquant le volume contenu dans une vésicule
 vol/vol : Rapport volumique
 V_{cell} : Volume de travail de la cellule
 V_i : Volume de l'injection « i »
 X_b : Fraction molaire de protéines liées
 X_b^* : Fraction molaire de protéines liées si la moitié des lipides sont accessibles
 X_f : Fraction molaire de protéines libres
 X_{PG} : Fraction molaire de phosphoglycérols
 Z_p : Charge effective de la protéine
 Z_{PG} : Valence des phosphoglycérols

Remerciements

Un travail de cette ampleur ne se fait pas seul. Avec toute la volonté du monde, sans l'encadrement et les précieuses recommandations d'un directeur de recherche rigoureux et passionné, je ne serais pas parvenue à vous présenter un travail d'aussi grande qualité. Ainsi, je dois remercier sincèrement Michel Lafleur.

À la croisée des chemins entre la chimie physique et la biologie, il faut accepter qu'on ne sait pas tout. Il faut partager ses connaissances avec des scientifiques venant d'autres milieux afin de parfaire la maîtrise de son sujet. De m'avoir initiée à l'univers des protéines, je remercie mon co-directeur Puttaswamy Manjunath.

Je tiens également à remercier le GEPROM de m'avoir fourni un soutien financier pour réaliser mon projet. Il y a également les gens qui ont participé directement à la réussite de mes expériences, soit Marjolaine Arseneault, Frank Pétriat, Annick Bergeron et Jean-Louis Schwartz. Je tiens à remercier chaudement tous ceux qui ont donné de la vie aux laboratoires, bureaux et salle de dîner. Merci Marjolaine, Geneviève, Guillaume, Martin, Marc-André, Gregory, Patrick, Lucie, Thida, Rémi, Étienne, François, et les autres.

La réalisation d'un tel projet ne peut se faire sans l'appui des gens qu'on aime. On a besoin de leur support et leur encouragements lorsqu'on se sent faiblir. Ces précieuses personnes méritent qu'on souligne leur contribution et elles sont Yannick, Lysanne, Philip, Janet, Marcel, Clément, Diane, Marie-Line, Valérie, Sara, Nathalie, Pat et Annie.

Au cours de ce périple, un événement fabuleux survenu. La venue d'Evelyne. Sans la compréhension et l'appui de tous, et particulièrement de vous, Michel, la réalisation de ce mémoire aurait pu être compromise. J'ai eu la chance d'avoir sur mon chemin des gens d'une grande bonté. Mille mercis.

À mon courage, Yannick.
À mon inspiration, Evelyne.

Chapitre 1 : Introduction

L'évolution de la structure des gamètes mâles est une étape indispensable dans le processus de la reproduction. Le liquide séminal bovin (ou plasma séminal bovin) contient une panoplie de molécules qui ont le potentiel d'agir avec les spermatozoïdes afin d'assurer leur capacité à fertiliser l'ovule. Les mécanismes qu'utilisent ces molécules pour arriver à leurs fins ne sont pas bien connus. Les protéines BSP (Bovine Seminal Plasma) font partie de la multitude de substances contenues dans le liquide séminal bovin. Cette famille de protéines semble interagir particulièrement avec la partie lipidique de la membrane des cellules reproductrices mâles. L'objectif de ce travail est d'acquérir de l'information sur la nature de ces interactions. Le titrage calorimétrique isotherme (ITC) a été utilisé pour étudier l'affinité entre les protéines BSP et des membranes lipidiques modèles. Cette technique a aussi servi à déterminer les segments des molécules de phospholipides qui interagissent avec les protéines. La microscopie de fluorescence ainsi que la technique des monocouches de Langmuir à pression constante ont été utilisées afin d'étudier la déformation des membranes induite par les protéines BSP.

1.1 Protéines BSP

Les protéines BSP font partie des molécules qui composent le liquide séminal bovin. Cette famille de protéines englobe 4 protéines : BSP-A1/A2 (environ 16 500 Da) ; BSP-A3 (environ 15 000 Da) et BSP-30kDa (environ 30 000 Da). Ces protéines sont acides, leur pI variant entre 3.6 et 5.2 (Manjunath and Thérien, I., 2002). Les BSP-A1/A2 ne diffèrent que par leur degré de glycosylation et sont considérées comme une seule protéine aussi connue sous le nom de PDC-109 (Esch et al., 1983). Les BSP-A1/A2 forment une proportion considérable du liquide séminal bovin, soit ~25 %(w/w) du total des protéines qu'il contient (Nauc

and Manjunath, P., 2000). Ces protéines sont synthétisées dans les vésicules séminales et se mélangent aux spermatozoïdes lors de l'éjaculation (Manjunath et al., 1994). La compréhension de ces interactions est importante pour l'industrie que constitue la reproduction bovine. Les connaissances acquises concernant les BSP pourront guider les recherches sur la fécondité des humains puisque des protéines analogues ont été identifiées chez l'homme (Fan et al., 2006).

Ces protéines sont nécessaires à la capacitation, soit le phénomène de déstabilisation de la membrane du spermatozoïde permettant la fécondation de l'ovule. La modification de la composition lipidique de la membrane du spermatozoïde est une étape importante de la capacitation (Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997; Manjunath and Thérien, I., 2002; Davis, 1981). Or, ces protéines induisent la diminution du rapport cholestérol/phospholipide, indispensable à la fécondation (Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997; Thérien et al., 1999). La structure de la BSP-A1/A2 (**Figure 1.1**) est apparentée à celle du domaine de type II de la fibronectine (Fn2) (Manjunath et al., 1988). La fibronectine est une protéine qui se lie spécifiquement au collagène grâce à ses domaines de type II (Baker, 1985). L'extrémité N-terminale de 23 résidus est suivie des deux domaines Fn2 consécutifs, ¹Fn2 et ²Fn2, comprenant les résidus 24-61 et 69-109 respectivement. Les résidus 61 à 68 forment un pont entre les deux domaines Fn2. Ces derniers sont constitués de deux ponts disulfures et de deux feuillets β antiparallèles séparés par deux tours irréguliers (Sticht et al., 1998; Constantine et al., 1992).

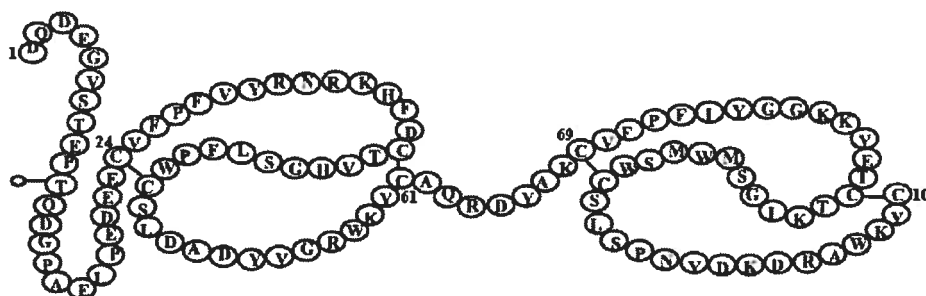


Figure 1.1 : Structure primaire de la BSP-A1/A2 (Manjunath and Thérien, I., 2002).

Un tracé de l'indice d'hydrophobicité des acides aminés qui composent la BSP-A1/A2 (**Figure 1.2**) permet d'évaluer le caractère amphiphile de cette protéine. Selon la méthode de calcul de Kyte & Doolittle (Kyte and Doolittle, R.F., 1982), un indice d'hydrophobicité positif représente un résidu hydrophobe et vice versa. Selon le tracé représenté ci-dessous, l'extrémité N-terminale (résidus 1 à 23) est entièrement hydrophile. Ceci s'explique par le fait que cette portion de la protéine est très riche en résidus acides. Le reste de la protéine contient à la fois des segments hydrophiles et hydrophobes, mais en somme cette portion de la protéine est moins hydrophile que l'extrémité N-terminale. Ainsi, le tracé obtenu indique que la BSP-A1/A2 est amphiphile.

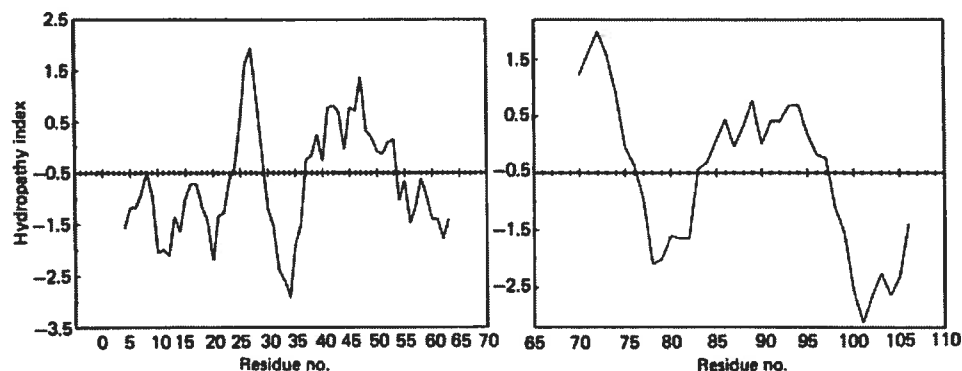


Figure 1.2 : Indices d'hydrophobicité, évalué selon la méthode de Kyte & Doolittle, des acides aminés de la BSP-A1/A2 (Seidah et al., 1987).

Le caractère sélectif des domaines de type Fn2 du collagène est aussi observable dans le cas de la liaison des BSP-A1/A2 aux membranes lipidiques. En effet, l'arrangement en tandem des domaines de type Fn2 contenu dans la protéine offrirait une surface hydrophobe partiellement exposée au solvant formant le site de liaison entre la protéine et les phospholipides (Sticht et al., 1998; Constantine et al., 1992). La disposition des domaines de type II serait telle que les sites liants de chaque domaine se retrouvent sur la même face de la molécule (Sticht et al., 1998; Desnoyers and Manjunath, P., 1993). Il est à noter que la présence des deux

domaines Fn2 serait requise pour la capacitation (Desnoyers and Manjunath, P., 1993; Moreau et al., 1998).

1.2 Membranes des spermatozoïdes

Les membranes cellulaires sont des matrices très complexes, mais leur structure de base en bicouche est assurée par des phospholipides. En milieu aqueux, ces molécules amphiphiles s'organisent en bicouche afin de minimiser les interactions défavorables entre leurs chaînes acyles et le milieu polaire. Une fonction évidente de la membrane d'une cellule est celle de délimiter deux milieux et de réguler ce qui traverse de l'un à l'autre. De plus, il existe une très grande variété de protéines membranaires qui accomplissent autant de tâches. La composition chimique d'une membrane cellulaire varie selon les fonctions qui lui sont destinées (Gennis, R.B., 1989).

Le spermatozoïde est une cellule conçue pour accomplir deux principales tâches, soit se mouvoir jusqu'à l'ovule et pénétrer à l'intérieur de celui-ci. La queue (ou le flagelle) est responsable de la première tâche et la tête, de la seconde (**Figure 1.3**).

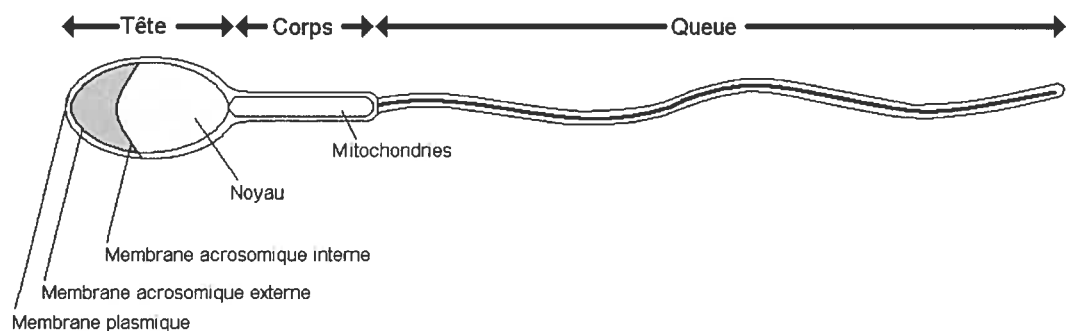


Figure 1.3 : Représentation schématique d'un spermatozoïde.

En effet, le flagelle est conçu de façon à assurer la mobilité du spermatozoïde et la tête, renfermant l'information génétique que procure le noyau, est recouverte de plusieurs membranes qui sont impliquées dans le processus de la capacitation. La partie centrale du spermatozoïde, le corps, contient les mitochondries qui fournissent de l'énergie à la cellule.

Puisque la tête et la queue de la cellule reproductrice mâle ont des fonctions très différentes, les lipides de la membrane forment des domaines macroscopiques (Gennis, R.B., 1989). En effet, la composition chimique de la membrane entourant la partie antérieure (tête et corps) du spermatozoïde diffère de celle entourant le flagelle (Gennis, R.B., 1989; Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997; Parks and Hammerstedt, R.H., 1985). Il y a une barrière, à la jonction du corps et du flagelle, qui bloque la diffusion des protéines membranaires d'un domaine à l'autre (Gennis, R.B., 1989). La composition lipidique de ces domaines varie également, puisqu'elle joue un rôle dans la régulation du déplacement des protéines membranaires.

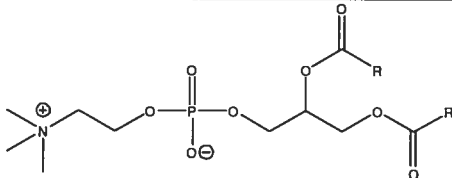
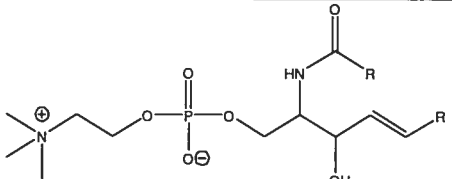
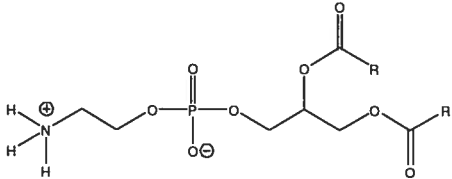
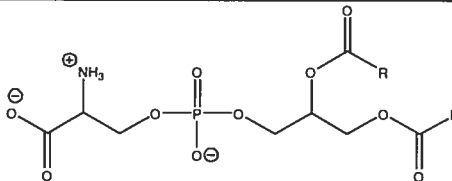
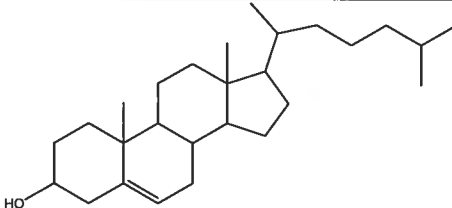
En raison de la grande variété de molécules se retrouvant dans les membranes cellulaires, il est souvent intéressant d'utiliser des membranes modèles. Ces dernières n'étant formées que de lipides synthétiques, le système à étudier est grandement simplifié. Puisque la présente étude se concentre sur les interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides, il est avantageux d'éliminer les composantes non-lipidiques de la membrane. Lors de l'hydratation des phospholipides, des vésicules multilamellaires (MLV, multilamellar vesicles) se forment spontanément, c'est-à-dire que les vésicules sont encapsulées les unes à l'intérieur des autres. Les MLV obtenues sont extrudées afin d'obtenir des vésicules unilamellaires (Nayar et al., 1989) de manière à exposer davantage les lipides aux protéines ajoutées subséquentement. De plus, l'extrusion assure une taille relativement uniforme de vésicules qui peut être vérifiée par des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS, dynamic light scattering). En forçant les MLV à passer au travers de pores de 0,1 μm , on les oblige à se réorganiser pour

former des vésicules unilamellaires (LUV, large unilamellar vesicles). Les LUV présentent une surface considérée comme étant plane pour les molécules qui interagissent avec celle-ci. Les grandes vésicules sont préférées aux petites (SUV, small unilamellar vesicles) car ces dernières offrent une surface courbe et une bicouche sous tension (De Kruijff et al., 1975), ce qui peut modifier l'affinité de la protéine pour la membrane (Rex and Schwarz, G., 1998; Constantinescu and Lafleur, M., 2004).

La composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes est résumée dans le **Tableau I**. Parmi les principaux phospholipides qui la composent, plus de 66% sont des cholines (phosphatidylcholine et sphingomyéline) et 17% sont des phosphatidyléthanolamines. Le cholestérol se combine aux phospholipides dans les membranes cellulaires, régulant leur rigidité. Dans la membrane des spermatozoïdes bovins, il y a approximativement 45 molécules de cholestérol pour 100 molécules de phospholipide (Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997; Davis, 1981). D'ailleurs, le rapport cholestérol/phospholipide serait modifié lors de la capacitation du spermatozoïde (Thérien et al., 1998; Thérien et al., 1999; Davis, 1981).

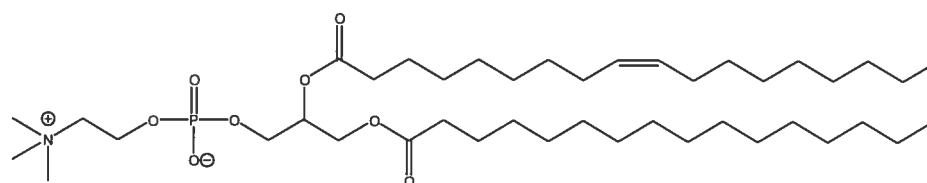
Pour les raisons évoquées précédemment, la présente étude se basera sur des membranes modèles afin d'imiter celle des spermatozoïdes. Le phospholipide qui servira de composant de base pour toutes les membranes modèles est la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC). Afin d'étudier l'effet de la composition lipidique des membranes sur les interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides, 30% (mol/mol) de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE), de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-[phospho-*rac*-(1-glycérol)] (POPG) ou de cholestérol seront incorporés aux vésicules de POPC. Les structures de la POPC, la POPE et du POPG sont illustrées à la **Figure 1.4**.

Tableau I : Composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes bovins (Selivonchick et al., 1980).(Nolan and Hammerstedt, R. H., 1997)

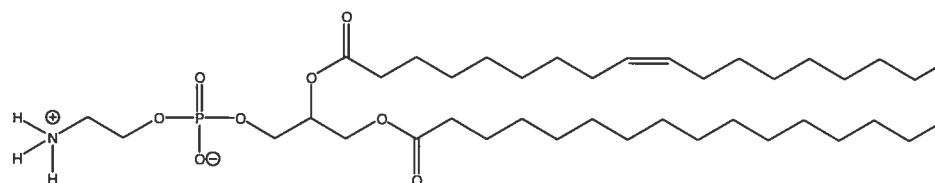
Type de lipide	Structure ^a	Rapport molaire ^b
Phosphatidylcholine (PC)		0,55
Sphingomyéline (SM)		0,11
Phosphatidyléthanolamine (PE)		0,17
Phosphatidylsérine (PS)		0,03
Cholestérol (Chol)		0,45

^aR sont des chaînes hydrocarbonées

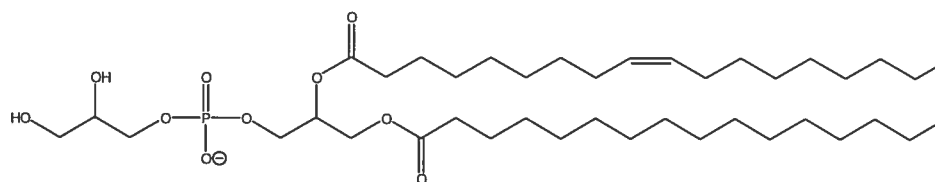
^bÉvalué par rapport au nombre (moles) total de phospholipides



POPC



POPE



POPG

Figure 1.4 : Structures des phospholipides utilisés pour former les membranes modèles.

La POPC a été choisie comme composant primaire puisqu'elle a une tête polaire choline, soit celle qui est la plus répandue dans la membrane des spermatozoïdes (**Tableau I**). Les chaînes apolaires de la POPC sont 16:0 (16 atomes de carbone, sans insaturation) et 18:1 (18 atomes de carbone avec 1 insaturation). Au niveau des chaînes, ce lipide est différent de ceux qui forment la membrane des spermatozoïdes (**Tableau II**). Dans cette membrane, la chaîne saturée la plus répandue (en position 1) est celle ayant 16 atomes de carbone. Cependant, la chaîne insaturée se trouvant en position 2 est généralement composée de 22 atomes de carbone et possède plusieurs insaturations, celle avec 6 insaturations étant la plus commune. La POPC a été sélectionnée du fait qu'elle reproduit l'architecture des membranes fluides et qu'elle est beaucoup moins dispendieuse que la phosphatidylcholine synthétique ayant les chaînes 16:0 et 22:6, par exemple. Également, les chaînes polyinsaturées sont très sensibles à l'oxydation (Shaikh et al., 2002) et nécessitent des conditions de travail particulières.

Tableau II : Description des chaînes apolaires (R_1 et R_2) des phosphatidylcholines qui forment la membrane plasmique des spermatozoïdes bovins (Selivonchick et al., 1980).

R_1		R_2	
Type de chaîne	% (wt/wt)	Type de chaîne	% (w/w)
14:0	0,5	22:4	0,5
16:0	97,8	22:5	23,4
18:0	0,8	22:6	71,9
18:1	0,5		

Les bicouches lipidiques peuvent adopter plusieurs phases en fonction de la température. La principale transition de phase des bicouches est le passage de la phase gel à la phase liquide cristalline (**Figure 1.5**). Dans la phase gel, la membrane est rigide, les chaînes acyles des lipides sont ordonnées et les lipides sont maintenus dans un arrangement compact. Dans la phase liquide-cristalline, la membrane est plutôt souple, les chaînes se meuvent plus librement et deviennent

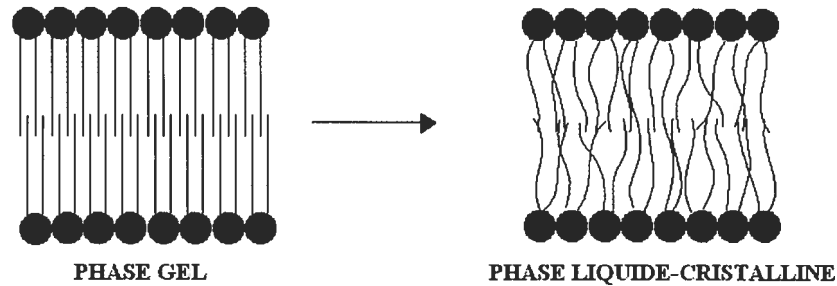


Figure 1.5 : Transition de phase d'une bicouche phospholipidique.

désordonnées, alors que les têtes polaires bougent aussi davantage (Gennis, R.B., 1989). La température à laquelle cette transition a lieu dépend de la nature des lipides qui forment la membrane. Chez les mammifères, les membranes cellulaires sont généralement dans la phase liquide-cristalline permettant, par exemple les échanges chimiques de part et d'autre de la membrane et le mouvement des protéines membranaires (Gennis, R.B., 1989).

1.3 Interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides

Les interactions entre la BSP-A1/A2 et les membranes lipidiques sont intéressantes puisqu'elles semblent jouer un rôle important dans le processus qui mène à la fécondité des spermatozoïdes, la capacitation. Les spermatozoïdes épидидymaires sont incapables d'accomplir la réaction de l'acrosome, soit la pénétration de l'enveloppe de l'ovule (la *zona pellucida*). La membrane des gamètes mâles doit subir une transformation afin d'effectuer cette réaction. La capacitation des spermatozoïdes se déroulerait en deux grandes étapes, la première lors de l'éjaculation et la seconde lors du passage dans le système reproducteur femelle, plus précisément dans les sécrétions de l'oviducte et des follicules ovariens (Manjunath and Thérien, I., 2002). Un schéma du mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins est présenté à la **Figure 1.6**. Lors de l'éjaculation, diverses sécrétions s'ajoutent aux spermatozoïdes provenant de

l'épididyme. Le liquide s'écoulant des glandes séminales compte parmi ces sécrétions. Les protéines du liquide séminal entrent alors en contact avec les spermatozoïdes. Elles interagissent avec les lipides de la membrane plasmique du spermatozoïde de façon à stimuler l'extraction de lipides (cholestérol et phosphatidylcholine). De nombreuses publications ont démontré que les protéines du liquide séminal bovin induisent une modification de la composition lipidique de la membrane des spermatozoïdes (Moreau et al., 1998; Thérien et al., 1998; Moreau and Manjunath, P., 1999; Moreau et al., 1999; Thérien et al., 1999; Moreau and Manjunath, P., 2000; Manjunath and Thérien, I., 2002). Plus particulièrement, la membrane subit une réduction de son contenu en cholestérol par rapport à celui en phospholipides (Thérien et al., 1998; Thérien et al., 1999; Davis, 1981). En effet, la protéine donne lieu à l'extraction d'environ 30% du cholestérol et 20% des phospholipides de type choline contenus dans la membrane (Thérien et al., 1998; Thérien et al., 1999). Cette observation a été effectuée en incubant les spermatozoïdes pendant 8 h en présence de la BSP-A1/A2 à une concentration de 120 µg/ml. Il est important de souligner que ces conditions *in vitro* ne sont pas pleinement compatibles avec la réalité physiologique car les spermatozoïdes ne demeurent pas en contact avec une telle concentration de protéines BSP pendant aussi longtemps. D'ailleurs, ces protéines seules ne seraient pas en mesure de diminuer le ratio cholestérol/phospholipide de façon à provoquer la capacitation dans un délai d'une vingtaine de minutes, soit un délai plus réaliste. Cependant, lorsque les lipoprotéines de haute densité (HDL) se jumellent aux protéines BSP, un tel délai est suffisant pour permettre à la capacitation d'avoir lieu (Thérien et al., 1997). C'est une fois à l'intérieur du système reproducteur femelle que les spermatozoïdes entourés de protéines BSP entrent en contact avec les HDL. Ces lipoprotéines jouent aussi un rôle dans le transport du cholestérol. Ainsi, il semble que les protéines BSP ne soient pas autonomes dans leur tâche. Cependant, l'importance du rôle des protéines BSP dans le processus menant les spermatozoïdes à la fécondité est évidente.

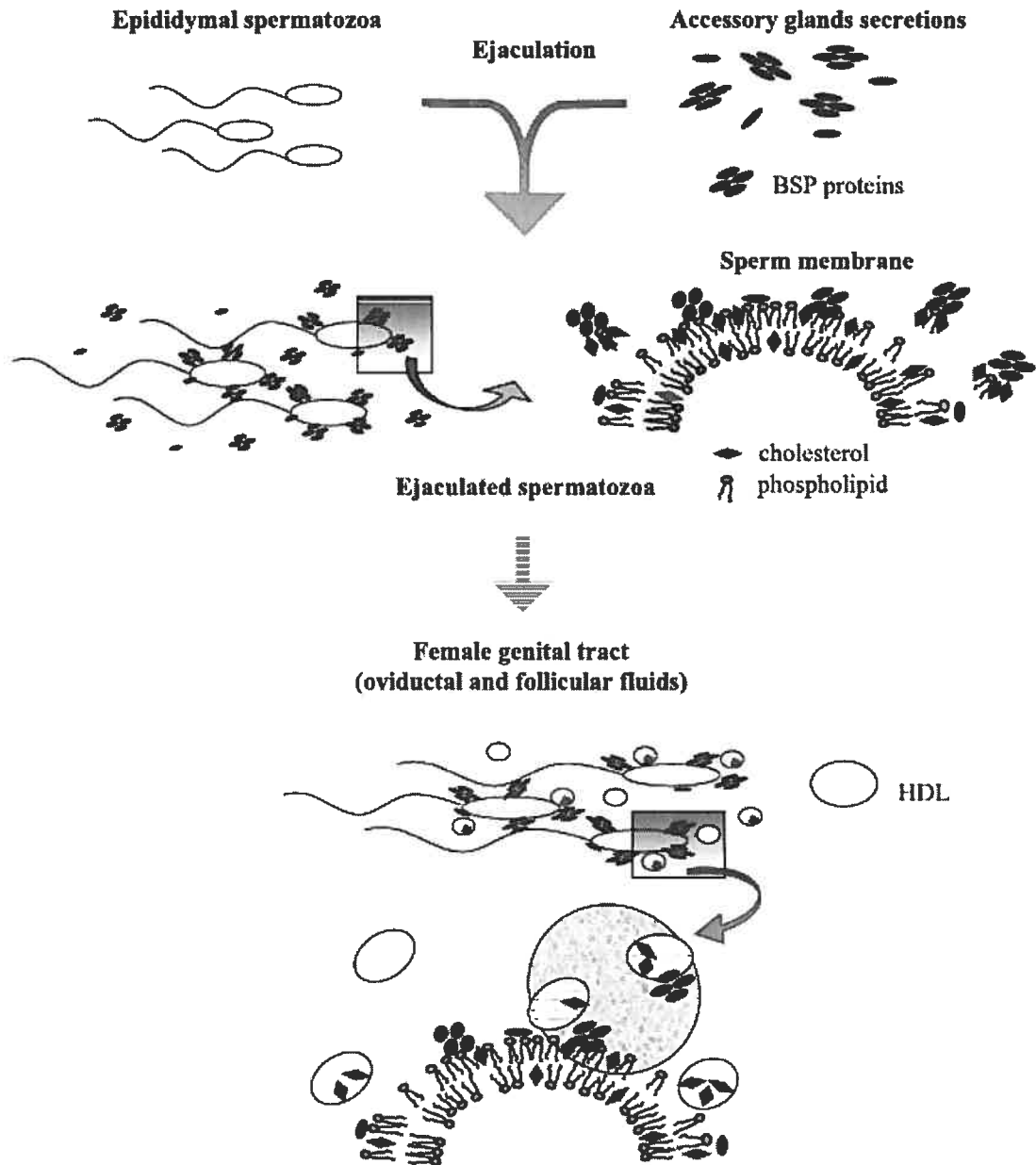


Figure 1.6 : Mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins par les protéines du liquide séminal bovin (Manjunath and Thérien, I., 2002).

Plusieurs travaux ont été effectués afin d'élucider les détails des interactions de la BSP-A1/A2 avec la membrane des spermatozoïdes. Cependant, le mécanisme d'extraction sélective de certains lipides de la membrane demeure inconnu. D'abord, la façon dont la protéine se lie à la membrane n'est pas clairement élucidée. Plusieurs études démontrent que le groupement choline de certains phospholipides serait le site de liaison de la protéine sur les membranes des spermatozoïdes (Ramakrishnan et al., 2001; Müller et al., 1998; Desnoyers and Manjunath, P., 1992). Cette observation est intéressante étant donné que les deux tiers des phospholipides formant la membrane des spermatozoïdes ont une tête polaire de type choline. Afin de localiser le site de liaison de la choline dans la protéine, la structure cristalline du complexe BSP/o-PC (ortho-phosphorylcholine) a été obtenue (Wah et al., 2002). Ce complexe serait formé de deux molécules de protéine et quatre de o-PC. Tel que mentionné précédemment, les cavités hydrophobes des domaines de type Fn2 seraient impliquées dans la liaison entre la protéine et la choline. D'autres études corroborent la propriété liante des domaines Fn2 (Sticht et al., 1998; Constantine et al., 1992). Aussi, il semblerait que l'arrangement en tandem des deux domaines Fn2 de la BSP-A1/A2 serait requis pour permettre la capacitation des spermatozoïdes (Moreau et al., 1998). L'étude du complexe BSP/o-PC indique que chaque domaine Fn2 comporterait un site de liaison. Deux types d'interactions régiraient chaque site de liaison. Premièrement, il y aurait une interaction électrostatique entre le cation de l'ammonium quaternaire de la choline et le cycle indole d'un résidu tryptophane (Trp). Deuxièmement, il y aurait des ponts H entre certains résidus tyrosines (Tyr) et le groupement phosphate du lipide (Wah et al., 2002). La stabilisation accrue du complexe grâce aux ponts H entre la protéine et le groupement phosphate de la phosphorylcholine expliquerait l'affinité accrue de la protéine pour cette molécule comparativement au chlorure de choline (Desnoyers and Manjunath, P., 1993). L'analyse de la structure cristalline du complexe BSP/o-PC démontre que le résidu tryptophane impliqué dans le site de liaison du domaine ¹Fn2 n'est pas l'analogue de celui du domaine ²Fn2. En effet, le tryptophane du premier domaine (Trp47) est plutôt interne alors que celui du second domaine (Trp106) est plutôt externe. Cette

divergence entre les deux sites de liaison fait en sorte que, bien que les sites se retrouvent sur la même face de la protéine, les deux molécules de o-PC liées adoptent des orientations différentes (Wah et al., 2002). Or, la phosphorylcholine est soluble dans le milieu aqueux contrairement aux phospholipides qui s'y auto-assemblent en bicouche. Ainsi, elle n'est pas soumise aux restrictions de mouvement et d'orientation que subissent les phospholipides dans une bicouche. Il n'est donc pas évident que les sites de liaisons identifiés pour la phosphorylcholine soient aussi bien définis et identiques à ceux des phospholipides dans la membrane des spermatozoïdes. Il existe une incohérence entre la stœchiométrie de la liaison BSP/o-PC et celle entre la BSP-A1/A2 et les vésicules de PC. En effet, plusieurs études démontrent que la liaison de la protéine à des membranes modèles formées de phospholipides de type choline se fait avec 10-12 lipides (cholines) par protéine (Ramakrishnan et al., 2001; Gasset et al., 2000; Müller et al., 1998). Ce rapport choline/protéine est beaucoup plus grand que celui reporté pour la phosphorylcholine soluble. De plus, l'interaction de la BSP-A1/A2 avec les spermatozoïdes a démontré qu'il y a formation d'un complexe qui contient 20 phospholipides (cholines) par protéine (Moreau and Manjunath, P., 1999). Ainsi, l'interaction de la protéine avec la choline soluble ne semble pas se dérouler de la même façon que pour la choline en bicouche. D'ailleurs, il a été observé que la protéine démontre une plus grande affinité pour les vésicules de choline que pour l'o-PC (Anbazhagan and Swamy, M. J., 2005). Cette observation met en évidence la différence de l'interaction de la protéine avec ces deux systèmes.

Il n'y a pas que les phospholipides de type choline qui interagissent avec la BSP-A1/A2. Des études indépendantes, une en RPE (résonance paramagnétique électronique) (Ramakrishnan et al., 2001) et l'autre en SPR (résonance plasmonique de surface) (Thomas et al., 2003) démontrent que l'affinité de la protéine pour la phosphocholine est la plus grande. Cependant, ces études ont aussi montré que la BSP-A1/A2 interagit de façon considérable avec des phospholipides ayant d'autres têtes polaires. Notamment, la protéine a démontré une certaine affinité pour les lipides portant les groupements PE et PS. Ceci est intéressant,

puisque de tels lipides se retrouvent dans la membrane des spermatozoïdes bovins (**Tableau I**). Les systèmes lipidiques utilisés en RPE diffèrent grandement de ceux utilisés en SPR. L'étude de l'affinité de la protéine pour un lipide particulier en RPE a été effectuée en incorporant une faible proportion (1% mol/mol) de ce lipide à des vésicules de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), un lipide possédant des chaînes saturées. De plus, cette technique nécessite que le lipide étudié soit marqué par un groupement nitroxyde. Or, en SPR, l'échantillon est une monocouche lipidique retenue sur un substrat métallique recouvert d'un film hydrophobe. Afin d'étudier l'interaction de la protéine avec un lipide particulier, le système lipidique consistait en une monocouche formée uniquement de ce lipide et de cholestérol (20% w/w), donc en absence de phosphocholine. Malgré ces divergences importantes, les deux techniques démontrent un ordre similaire d'affinité de la protéine pour différentes têtes polaires : PC > PG ~ PA > PE. Le fait que la protéine puisse reconnaître différentes têtes polaires affaiblit l'hypothèse d'un site de liaison très précis tel que celui décrit pour la choline soluble (Wah et al., 2002). Effectivement, d'autres types d'interactions peuvent participer à l'adsorption de la protéine sur la membrane des spermatozoïdes. De plus, il est à noter que les systèmes phospholipidiques mixtes, respectant les proportions retrouvées dans la membrane des spermatozoïdes, ont été plutôt négligés lors d'études menées dans le passé. Néanmoins, quelques études ont démontré que la BSP-A1/A2 n'interagit pas directement avec le cholestérol (Desnoyers and Manjunath, P., 1992; Moreau and Manjunath, P., 1999; Müller et al., 2002). Toutefois, l'effet de sa présence dans les membranes ne doit pas être négligé. Dans une proportion similaire à celle observée dans la membrane des spermatozoïdes, la présence du cholestérol dans les membranes de PC entraînerait une importante hausse (50%) du nombre de lipides par protéine liée (Swamy et al., 2002). Ainsi, la combinaison de différents types de lipides influencerait l'interaction entre la protéine et la membrane. Enfin, la BSP-A1/A2 aurait davantage d'affinité pour les membranes de phosphocholine, mais ne démontrerait pas une sélectivité absolue. Cette observation, ainsi que celle de la stœchiométrie

variable de l'association protéine/lipide, semblent indiquer que cette interaction est complexe et nécessite davantage d'investigation.

Les répercussions de cette association sur la structure de la protéine et des lipides ont été étudiées. D'abord, des études indiquent une modification de la conformation de la protéine suite à sa liaison à la phosphorylcholine (o-PC). Lorsque la protéine est liée à la phosphorylcholine (o-PC), certains éléments de sa structure secondaire seraient modifiés par rapport à l'état libre. En effet, des observations en dichroïsme circulaire et en spectroscopie infrarouge indiquent que la proportion de tours augmenterait, au dépend d'une diminution de celle des structures désordonnées (Gasset et al., 1997). Aussi, l'analyse de la structure cristalline de la protéine liée à l'o-PC montre qu'un segment du premier domaine Fn2 doit s'approcher du site de liaison de la choline afin d'interagir avec elle (Wah et al., 2002). De tels changements de conformation déstabiliseraient la structure quaternaire de la protéine. À l'état libre, la BSP-A1/A2 formeraient un mélange d'oligomères (principalement des tétramères) et se dissocieraient pour former surtout des dimères lorsque liées à l'o-PC (Gasset et al., 1997; Calvete et al., 1999). L'étude de la structure cristalline du complexe BSP/o-PC supporte cette observation en démontrant que les molécules de protéine sont associées en paires (Wah et al., 2002). La formation de dimères serait favorisée par la modification de la structure secondaire de la protéine. En effet, sa liaison à l'o-PC ferait en sorte que certains acides aminés du domaine ¹F_{n2} se retrouveraient exposés au solvant. Or, ces derniers seraient stabilisés par des interactions favorables avec quelques résidus du domaine ²F_{n2} d'une autre molécule de BSP-A1/A2 (Wah et al., 2002). Somme toute, la protéine serait plus stable sous sa forme liée que sous sa forme libre. Supportant cette conclusion, une étude en calorimétrie différentielle à balayage (DSC) indique un accroissement de la température de dénaturation de la protéine lorsqu'elle est liée à l'o-PC (Gasset et al., 1997).

Les études citées ci-haut permettent de confirmer que la BSP-A1/A2 interagit avec la phosphorylcholine soluble. Cependant, les modifications dans la

structure de la protéine suite à sa liaison avec l'o-PC ne sont pas nécessairement les mêmes que celles qui ont lieu lors de son association aux membranes. Quelques études ont été menées afin d'investiguer la structure de la protéine avant et après son association aux vésicules lipidiques. Ces études démontrent des changements similaires à ceux observés lors de l'interaction de la protéine avec la choline soluble. En effet, des mesures de la fluorescence intrinsèque de la protéine (provenant surtout des résidus Trp) en absence et en présence de vésicules de PC ont témoigné d'une variation de l'environnement de ces résidus fluorescents (Müller et al., 1998; Gasset et al., 2000). En effet, un déplacement hypsochromique du maximum d'émission des résidus Trp indique qu'ils se retrouvent dans un environnement moins polaire lorsque la protéine est liée. Cette observation a aussi été faite suite à l'interaction de la protéine avec la choline en solution (Gasset et al., 1997). De plus, suite à son interaction avec des vésicules de PC, la protéine subirait un changement de conformation qui exposerait davantage ses liens peptidiques au milieu aqueux (Gasset et al., 2000). Un effet analogue aurait été obtenu suite à l'association de la protéine à la choline soluble (Gasset et al., 1997). À priori, il semble que la BSP-A1/A2 se réarrange de façon similaire lorsqu'elle interagit avec la choline en bicouche ou en solution. Cependant, les renseignements concernant la structure de la protéine associée à des bicouches sont beaucoup moins détaillés que ceux obtenus pour le système BSP/o-PC.

Les perturbations des membranes lipidiques par la protéine ont fait l'objet de quelques études (Ramakrishnan et al., 2001; Gasset et al., 2000; Müller et al., 1998; Greube et al., 2001). Notamment, des mesures en RPE ont montré que la BSP-A1/A2 diminuerait la fluidité des membranes de PC auxquelles elle s'associe (Müller et al., 1998; Greube et al., 2001; Ramakrishnan et al., 2001). Il est proposé que la protéine n'interagit pas qu'avec les têtes polaires, mais aussi avec l'intérieur apolaire des membranes. La rigidification des chaînes acyles par la protéine serait plus efficace sur les lipides ayant une tête choline plutôt que ceux ayant une tête éthanolamine (Greube et al., 2001). En effet, des observations en RPE démontrent que la protéine affecte davantage la mobilité des chaînes des phospholipides de

type PC que ceux de types PE, lorsque ces derniers sont incorporés dans des membranes de PC (Greube et al., 2001). D'autre part, l'étude des modes de vibration des phospholipides en spectroscopie infrarouge a montré une augmentation du désordre de leurs chaînes apolaires et de l'hydratation de leurs groupements carbonyles en présence de la protéine (Gasset et al., 2000). Aussi, une étude du comportement thermotropique de vésicules indique que la protéine inhiberait la transition de phase de la bicouche (Gasset et al., 2000). Une baisse importante de l'enthalpie molaire de cette transition alors que le rapport protéine/lipide augmente témoignerait de cet effet. L'intégrité de vésicules de PC suite à leur interaction avec la BSP-A1/A2 a également été étudiée (Gasset et al., 2000). En premier lieu, elle a été observée directement grâce à la microscopie électronique. Des LUV ayant environ 100 nm de diamètre ont été mises en contact avec la protéine dans un ratio lipide:protéine de 50:1. Or, les micrographes obtenus ont démontré que la surface des vésicules devient moins lisse et définie et qu'il y a formation de petites particules de 10 à 40 nm de diamètre. En second lieu, l'intégrité des vésicules a été évaluée en spectroscopie de fluorescence. Le taux de libération d'une sonde fluorescente encapsulée dans les vésicules de PC a été mesuré. Cette expérience indique que la protéine perturberait la membrane de façon à augmenter sa perméabilité. Or, il est intéressant de constater que la présence de cholestérol dans ces mêmes vésicules, dans des proportions similaires à celles retrouvées dans les membranes des spermatozoïdes, inhiberait cette perturbation (Gasset et al., 2000). La présence de cholestérol semble, une fois de plus, importante et ne devrait pas être négligée.

L'extraction de lipides de la membrane des spermatozoïdes par la BSP-A1/A2 pourrait s'expliquer par la formation des petites particules observées en microscopie électronique (Gasset et al., 2000). Dans une autre étude, la chromatographie d'exclusion de taille a permis d'isoler des complexes issus de l'interaction de la BSP-A1/A2 avec la membrane (Moreau and Manjunath, P., 1999). Ces complexes seraient de taille uniforme et composés de protéine, de cholestérol et de phosphatidylcholine dans un ratio molaire de 1:24:20,

respectivement. La formation d'agrégats stables composés de protéines (ou de peptides) et de lipides a déjà été observée, notamment dans le cas de la mélittine (Dempsey, 1990).

L'interaction entre la BSP-A1/A2 et les membranes de phosphocholine conduit à des changements morphologiques importants, mis en évidence grâce à des images en microscopie électronique (Lafleur et Edwards, communication personnelle). Typiquement, les dispersions multilamellaires ont une forme plutôt sphérique (**Figure 1.7A**). Or, en présence de la protéine, les membranes se réorganiseraient pour former une structure ressemblant à un collier de perles (**Figure 1.7B**) ou de longs tubes (**Figure 1.7B et C**). Ces derniers auraient des diamètres de l'ordre de 20-150 nm et des longueurs pouvant atteindre plusieurs μm . Il semble que l'origine de ces longs filaments soit un liposome lipidique qui constituerait un véritable réservoir de lipides (**Figure 1.7D**). Récemment, des réorganisations similaires ont été observées suite à l'interaction de certaines substances avec des liposomes. En effet, des molécules de diverses natures (ions, détergents et protéines) induiraient la déformation de vésicules phospholipidiques. Entre autres, les ions lanthanides (La^{3+} et Gd^{3+}) induiraient la formation de « colliers » similaires à ceux observés pour la BSP-A1/A2 (Tanaka et al., 2002). Aussi, des protubérances apparaîtraient sur les vésicules en présence de certains détergents (ex : Triton X-100) (Staneva et al., 2005) et de l'enzyme phospholipase A_2 (Staneva et al., 2004). Dans tous ces cas, les déformations des membranes seraient dues à un déséquilibre des aires des feuillet externe et interne de la bicouche. Ceci donnerait lieu à une courbure de la bicouche, de laquelle découlerait un changement de la morphologie des vésicules. Les structures observées par Lafleur et Edwards suggèrent que la BSP-A1/A2 conduit à un débalancement des aires moléculaires des 2 feuillets. Toutefois, à ce point-ci, il n'y a pas d'information à savoir si la protéine augmente ou diminue le feuillet lipidique externe avec lequel elle interagit vraisemblablement.

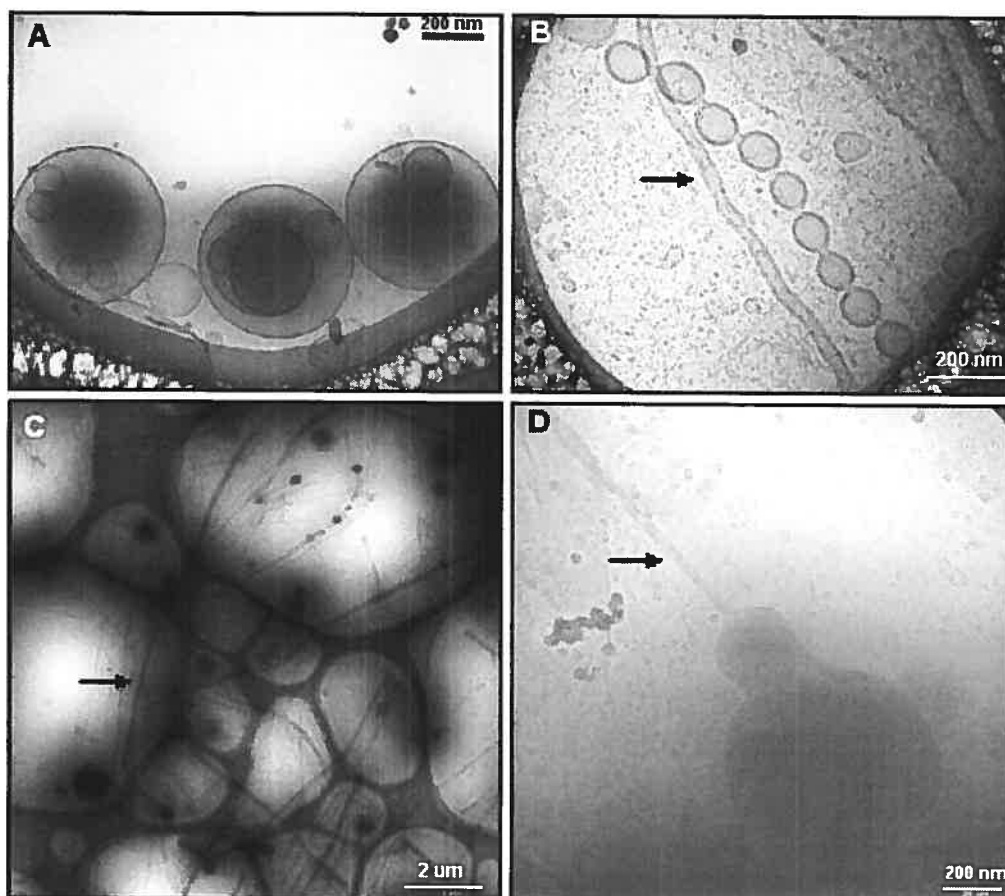


Figure 1.7 : Modification de la morphologie de vésicules (MLV) de phosphocholine par la BSP-A1/A2. (A) Allure typique de MLV (El Jastimi et al., 1999). (B) Structures en « collier » et en tube observées lorsque des MLV de phosphocholine sont en présence de la protéine BSP-A1/A2 (ratio PC/BSP de 48). (C) Des structures tubulaires à plus faible grossissement. (D) Un tube semble se former à partir d'une protubérance sur une MLV. Les structures tubulaires sont indiquées par des flèches. Le réseau poreux correspond à la mousse polymère sur laquelle l'échantillon est déposé.

1.4 Titration calorimétrique isotherme (ITC)

Le titration calorimétrique isotherme (ITC) est une technique relativement nouvelle permettant l'étude des interactions entre différentes molécules. Entre autres, cette technique a été appliquée à l'association de peptides (Seelig, 1997; Breukink et al., 2000; Wieprecht et al., 1999; Wenk and Seelig, J., 1998; Seelig et al., 1993; Wieprecht et al., 2000) et de surfactants (Heerklotz and Seelig, J., 2000; Keller et al., 1997; Hildebret et al., 2002; Heerklotz et al., 1998; Wenk and Seelig, J., 1997; Heerklotz et al., 1996) à des membranes. Cette technique permet de mesurer *in situ* l'enthalpie de réaction entre deux réactifs. Il est à noter que, dans cette section, le système étudié sera décrit pour le titration de LUV par la protéine. Or, les mêmes notions sont applicables au titration de segments solubles de phospholipides par la protéine.

1.4.1 La technique

Le calorimètre comprend une cellule de référence remplie d'eau et une cellule expérimentale qui contient un des réactifs en solution. Chaque cellule a un volume d'environ 1,5 ml. Le second réactif est injecté à l'aide d'une seringue dont l'aiguille est insérée dans la cellule expérimentale. Un système motorisé livre des injections d'un volume précis à des intervalles de temps donnés. Selon le type d'interaction entre les deux réactifs, il y aura absorption (réaction endothermique) ou libération (réaction exothermique) de chaleur. Cette variation est automatiquement compensée par l'appareil, afin de maintenir la cellule expérimentale à la même température que la cellule de référence. L'énergie nécessaire pour compenser cette différence de température est enregistrée par le calorimètre et convertie en joules/moles. Il est à noter que cet appareil est très sensible, pouvant détecter des variations de 10^{-8} J/mol. Cette sensibilité permet d'utiliser de faibles concentrations ($\sim 10^{-3}$ M) et l'ajout de volumes restreints (quelques μL).

Dans cette étude, les vésicules extrudées sont placées dans la cellule expérimentale et la BSP-A1/A2 est injectée sur les membranes. L'enthalpie de l'interaction des protéines avec les vésicules est mesurée. Chaque injection « i » donne une enthalpie partielle Δh_i (**Figure 1.8**). L'enthalpie molaire de réaction (ΔH_{mol}) peut être obtenue lorsque de petites quantités de protéines sont injectées à un grand excès de lipides, assurant ainsi une liaison complète des protéines injectées. On s'assure de ces conditions lorsque quelques injections conduisent à des pics dont l'aire est constante. Il est aussi intéressant d'effectuer un titrage des vésicules par la BSP-A1/A2 jusqu'à saturation des sites de liaisons afin d'analyser l'affinité entre les deux réactifs. Il existe plusieurs modèles qui permettent d'interpréter ces titrages et ils seront discutés ultérieurement.

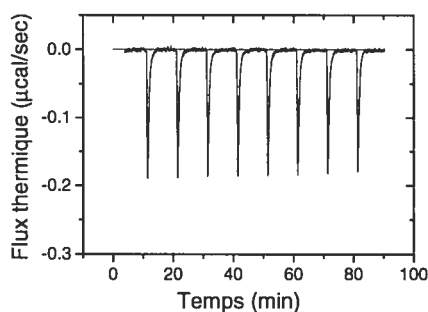


Figure 1.8 : Exemple de titrage isotherme visant à déterminer l'enthalpie. Chaque pic correspond à une injection de protéine à une suspension lipidique.

Il est à noter qu'une correction doit être apportée à la concentration des LUV à l'intérieur de la cellule au cours du titrage. Au début de l'expérience, la cellule est remplie de la suspension de vésicules. Lors des injections, le volume de l'échantillon augmente, mais le trop-plein (ΣV_i) est déplacé dans un tube. Les échanges de chaleur à ce niveau ne sont pas détectés par le calorimètre; le design du calorimètre est dit à volume de travail fixe (V_{cell}). Selon la conception de l'appareil (MicroCal, MA, US ; *ITC Data Analysis in Origin, Tutorial Guide*, version 5.0, 1998), la concentration des réactifs n'est pas homogène dans tout le

volume de la cellule et du trop-plein. La concentration en réactif dans le trop-plein est considérée comme la moyenne des concentrations au départ et après l'injection « i ». Afin de tenir compte de ces particularités, la concentration des LUV doit être corrigée. La concentration effective des LUV dans la cellule de travail après l'injection « i » est obtenue à l'aide de l'équation suivante :

$$C_{L,eff} = \left(\frac{C_L}{2} \right) \frac{\left(1 - \frac{\sum V_i}{2V_{cell}} \right)}{\left(1 + \frac{\sum V_i}{2V_{cell}} \right)} \quad \text{Équation 1.1}$$

où C_L est la concentration de lipide initiale dans la cellule et V_i est le volume ajouté à la cellule à l'injection « i ». Étant donné qu'il n'y a aucune indication de la translocation de la BSP-A1/A2, seuls les lipides du feuillet externe sont considérés comme étant exposés aux protéines. Ainsi, les concentrations en lipides sont systématiquement divisées par deux pour les systèmes vésiculaires. En ce qui concerne le titrant, soit la protéine, sa concentration effective lors du titrage, C_{BSPeff} , est donnée par la relation suivante :

$$C_{BSPeff} = \left(\frac{C_{BSP,S} n_i V_i}{V_{cell} + \left(\frac{n_i V_i}{2} \right)} \right) \quad \text{Équation 1.2}$$

où $C_{BSP,S}$ est la concentration de la solution de protéines à l'intérieur de la seringue.

1.4.2 Modèle de partage

Un des modèles qui peut être appliqué à l'analyse des interactions entre les protéines et les membranes lipidiques est basé sur le partage de la protéine entre la phase aqueuse et la phase lipidique, la membrane étant considérée comme une pseudo-phase (Lau et al., 1981). L'équilibre du partage de la protéine entre les deux phases est décrit par la constante de partage, K_p :

$$K_p = \frac{X_b}{X_f} \quad \text{Équation 1.3}$$

où X_b est la fraction molaire de protéines liées aux vésicules (indice b est pour « bound ») et X_f est la fraction molaire de protéines libres en solution (indice f est pour « free »). Comme la concentration de protéine libre est très faible ($\sim 10^{-6}$ M) par rapport à la concentration de l'eau (55 M), il est possible de faire l'approximation décrite par l'Équation 1.4.

$$X_f = \frac{C_f}{C_f + C_{\text{eau}}} \approx \frac{C_f}{C_{\text{eau}}} \quad \text{Équation 1.4}$$

De plus, comme la quantité de protéine liée est environ dix fois moindre que la quantité de lipides dans la cellule, il est possible de faire l'estimation suivante :

$$X_b = \frac{n_{P,b}}{n_L + n_{P,b}} \approx \frac{n_{P,b}}{n_L} \quad \text{Équation 1.5}$$

où $n_{P,b}$ est le nombre de moles de protéines liées aux vésicules et n_L est le nombre de moles de lipides accessibles aux protéines. La valeur de $n_{P,b}$ est obtenue, connaissant l'enthalpie molaire de réaction, à l'aide de l'équation suivante :

$$n_{P,b} = \frac{\sum_i \Delta h_i}{\Delta H_{mol}} \quad \text{Équation 1.6}$$

où Δh_i est la chaleur correspondant à l'injection « i ». Cette équation repose sur l'hypothèse que ΔH_{mol} est constant durant tout le titrage. L'enthalpie molaire de réaction est obtenue en effectuant un titrage en grand excès de lipides, de façon à ce que toutes les protéines injectées soient liées. Dans ce cas, l'enthalpie partielle (h_i) associée à chaque injections « i » est identique et ΔH_{mol} correspond à h_i /nombre de moles de protéine injectée.

Il a été suggéré que seulement la moitié des lipides est accessible aux protéines. Afin de préciser que ceci est considéré, la fraction molaire de protéines liées est représentée par X_b^* .

$$X_b^* = \frac{n_{P,b}}{n_L/2} \quad \text{Équation 1.7}$$

Ainsi, la constante de partage K_p (en M^{-1}) peut être exprimée par l'approximation suivante :

$$K_p = \frac{X_b^*}{C_f} \quad \text{Équation 1.8}$$

L'isotherme obtenu en traçant la courbe de X_b^* en fonction de C_f devrait donner une relation linéaire dont la pente correspond au coefficient de partage, K_p . Cependant, les isothermes obtenus lors de la présente étude ne sont pas linéaires. En conséquence, des modèles plus complexes doivent être utilisés pour l'analyse quantitative des données.

1.4.3 Modèle de Seelig (Gouy-Chapman)

Le modèle du partage de la protéine entre deux phases ne tient pas compte des interactions électrostatiques entre les protéines et la surface chargée de la bicouche. De telles contributions électrostatiques peuvent être responsables de la courbure de l'isotherme. Il est possible de tenir compte de ce phénomène à partir de la théorie de Gouy-Chapman, il s'agit du modèle de Seelig (Beschiaschvili and Seelig, J., 1990).

Pour un système incluant des composantes chargées, la densité de charge sur la membrane donne lieu à un gradient de concentration en protéine, si elle est chargée, de la membrane jusqu'au cœur de la phase aqueuse. Le modèle de Gouy-Chapman permet de tenir compte des interactions électrostatiques entre la protéine et la membrane en utilisant une relation analogue à celle de l'Équation 1.8. En effet, C_f (concentration de protéine au cœur de la phase aqueuse) peut être remplacée par C_M (concentration de protéine libre en solution, à proximité de la membrane). On peut calculer la variation de concentration de protéine libre en tenant compte de la charge effective de la protéine (Z_P) et du potentiel (ϕ_0) de surface de la membrane (Équation 1.9)

$$C_M = C_f \cdot \exp\left(\frac{-Z_P F_0 \phi_0}{RT}\right) \quad \text{Équation 1.9}$$

Dans cette équation, F_0 est la constante de Faraday, R est la constante des gaz et T est la température. En remplaçant C_f par C_M dans l'Équation 1.8, il est possible de tracer X_b^* en fonction de C_M . L'isotherme obtenu devrait donner une droite dont la pente correspond au coefficient de partage interfacial (K_P^{int}).

Lorsqu'une protéine chargée s'adsorbe à l'interface, il y a modification de la densité de charge de l'interface (σ). Les valeurs de σ après injections de protéine sont calculées selon l'Équation 1.10 :

$$\sigma = \left(\frac{e}{A_L} \right) (Z_{PG} \cdot X_{PG} + Z_P \cdot X_b^*) \quad \text{Équation 1.10}$$

où e est la charge élémentaire, A_L est l'aire occupée par un phospholipide (de PC ou de PG) dans une bicouche (68 \AA^2) (Beschiaschvili and Seelig, J., 1990), Z_{PG} est la valence des phosphoglycérols, X_{PG} est la fraction molaire de ce type de lipide dans la membrane et Z_P est la charge effective de la protéine (exprimée en densité de charge élémentaire). La densité de charge à l'interface de la membrane et le potentiel de la membrane sont reliés selon l'équation suivante :

$$\sigma^2 = 2000 \varepsilon_0 \varepsilon_r RT \sum_i [C_i \cdot ((\exp(-z_i F_0 \phi_0)/RT) - 1)] \quad \text{Équation 1.11}$$

où ε_0 est la permittivité du vide, ε_r est la permittivité relative du milieu (l'eau) et C_i est la concentration de la composante « i » au cœur de la phase aqueuse. Les composantes « i » considérées sont les ions, positifs et négatifs, formés suite à la dissociation du tampon (concentration estimée à 5 mM) et la protéine libre en solution (dont la concentration correspond à C_f). Il est à noter que la contribution des contres-ions de la protéine n'est pas considérée. Connaissant les valeurs de σ pour chaque injection (Équation 1.10), il est possible d'obtenir la valeur de ϕ_0 correspondante. Une méthode itérative permet d'effectuer ce calcul pour différentes valeurs de Z_P . La charge effective de la protéine est celle permettant l'obtention de l'isotherme le plus linéaire. Cet isotherme permet de déterminer la valeur de la constante de partage K_P^{int} (Seelig, 1997; Heerklotz and Seelig, J., 2000).

Cette constante décrit un équilibre de partition de la protéine entre la membrane et la phase aqueuse à proximité de la membrane. Afin de tenir compte de la contribution des interactions de longue portée qui entraînent la protéine du

cœur de la phase aqueuse jusqu'à la membrane, la constante K_{tot} (en M^{-1}) est définie :

$$\Delta G_{\text{tot}} = -RT \ln (K_{\text{tot}} \cdot C_{\text{eau}}) \quad \text{Équation 1.12}$$

où ΔG_{tot} est l'énergie libre de Gibbs totale de partition de la protéine. Cette énergie correspond à la somme de l'énergie libre reliée à l'équilibre à proximité de l'interface (ΔG_{int}) et de l'énergie libre reliée aux interactions de longue portée (ΔG_{long}). Afin d'obtenir K_{tot} , ΔG_{int} et ΔG_{long} doivent être connues. Puisque le modèle de Gouy-Chapman permet de déterminer K_P^{int} , Z_P et ϕ_o , l'Équation 1.13 peut être utilisée afin d'obtenir ces valeurs.

$$\Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{\text{long}} = -RT \ln (K_P^{\text{int}} \cdot C_{\text{eau}}) + Z_P F_o \phi_o \quad \text{Équation 1.13}$$

1.4.4 Modèle de Scatchard

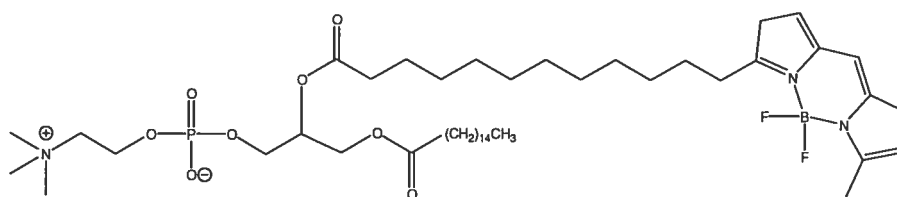
Le modèle de Scatchard offre une approche différente pour décrire l'interaction de la protéine avec les membranes. La théorie de Gouy-Chapman considère qu'il y a saturation en raison de la répulsion électrostatique grandissante entre les protéines en solution et les protéines liées à la membrane. Le modèle de Scatchard, correspondant à l'isotherme de Langmuir, associe la saturation à l'encombrement stérique entre les protéines à l'interface. Le modèle ne fait appel à aucun paramètre ajustable. Il a récemment été utilisé afin de décrire l'association de la BSP-A1/A2 et les lipides lors d'une étude SPR (Thomas et al., 2003). Ce modèle se base sur l'hypothèse que les vésicules lipidiques offrent un nombre défini de sites de liaison, qui sont indépendants et équivalents. Ces sites sont caractérisés par une constante d'affinité, K . L'isotherme de Scatchard est décrit par l'Équation 1.14.

$$\frac{X_b^*}{C_f} = -K \cdot X_b^* - \frac{K}{n_{LP}} \quad \text{Équation 1.14}$$

Selon cette relation la courbe de X_b^*/C_f en fonction de X_b^* devrait donner une droite dont la pente correspond à la constante d'affinité (K) et dont l'ordonnée à l'origine permet de déterminer le nombre de lipides par protéine liée (n_{LP}).

1.5 Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence permet de faire l'imagerie d'un système, à l'échelle du micromètre, à condition qu'au moins une de ces composantes fluoresce naturellement ou qu'elle soit marquée artificiellement par un fluorophore. Une multitude de phospholipides marqués sont disponibles commercialement. Ils peuvent être marqués au niveau de leur tête polaire ou de leurs chaînes hydrophobes. En incorporant une faible proportion de phospholipides fluorescents aux membranes modèles, il est possible de les observer en microscopie de fluorescence. Dans la présente étude, la sonde utilisée est une phosphocholine ayant un groupement fluorescent sur la chaîne en position 1, la β -BODIPY® 500/510 C₁₂-HPC (**Figure 1.9**).



β -BODIPY® 500/510 C₁₂-HPC

Figure 1.9 : Structure du phospholipide fluorescent utilisé pour marquer les membranes modèles de POPC.

Advenant des modifications morphologiques des vésicules, elles seraient possiblement observables par cette technique. Un avantage important de la microscopie de fluorescence par rapport aux autres techniques d'imageries, telles que la microscopie électronique et la microscopie optique, est la possibilité de différencier les composantes du système, en utilisant des marqueurs qui émettent de la fluorescence à différentes longueurs permettant ainsi d'en examiner la colocalisation.

1.6 Monocouches de Langmuir

La technique de Langmuir permet d'étudier l'interaction d'une substance en solution dans la sous-phase aqueuse avec une monocouche qui se trouve à l'interface air-eau. Une monocouche de lipides constitue un modèle intéressant pour étudier les phénomènes physico-chimiques impliquant les membranes. Cette technique permet de choisir, comme paramètres du système à étudier, la densité moléculaire et la pression de surface du film à l'interface air-eau, la composition de la sous-phase et la température. La technique de Langmuir sert en autres à étudier les interactions entre les phospholipides et diverses molécules. Notamment, cette technique peut être utilisée afin de caractériser les interactions entre les lipides et les macromolécules, telles que les polymères synthétiques et les protéines (Pétriart et al., 2004; Bos and Nylander, T., 1996). Il est possible de déterminer si les molécules contenues dans la sous-phase s'insèrent dans la monocouche lipidique et même d'en étudier la cinétique.

1.6.1 Pression de surface (II)

La technique de Langmuir permet d'étudier l'interface qui délimite une phase gazeuse (air) et une phase liquide (sous-phase aqueuse). On qualifie de tensioactive les molécules qui s'adsorbent à l'interface air-eau. Étant habituellement amphiphiles, elles se placent préférentiellement à l'interface de façon

à minimiser les interactions défavorables entre leur partie hydrophobe et la phase aqueuse. Lorsque de telles molécules forment une couche à l'interface, elles modifient les propriétés de celle-ci. Notamment, la tension superficielle est modifiée par rapport à celle de l'eau pure ($\gamma_0 = 72,9$ mN/m). La pression de surface (Π) est définie par la différence de tension superficielle induite par la présence de molécules tensioactives :

$$\Pi = |\gamma_0 - \gamma| \quad \text{Équation 1.15}$$

où γ_0 est la tension superficielle de l'eau à 25 °C et à une pression de 1 atmosphère et γ est la tension superficielle mesurée du film à l'interface air-eau.

1.6.2 Le bain Langmuir

Le bain Langmuir (**Figure 1.10**) est constitué d'une cuve dans laquelle se trouve la sous-phase, une barrière motorisée qui fait varier l'aire de l'interface (A) et une plaque de Wilhelmy qui mesure la pression de surface (Π). Les variations de la pression de surface et/ou de l'aire interfaciale sont une indication des phénomènes moléculaires qui ont lieu à l'interface. L'appareil de Langmuir offre trois modes d'acquisitions : Π en fonction de A (isotherme de compression); Π en fonction du temps avec A constante et, finalement, A en fonction du temps avec Π constante.

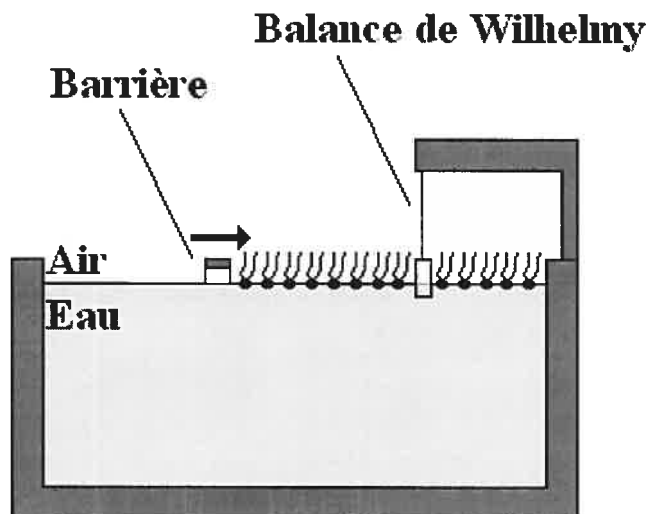


Figure 1.10 : Schéma du bain de Langmuir.

1.6.3 Isotherme de compression (Π -A)

La mesure de la pression de surface en diminuant l'aire de l'interface permet d'obtenir l'isotherme de compression (**Figure 1.11**). Cette courbe donne de l'information sur les interactions entre les molécules et la stabilité de la monocouche. Cette dernière se trouve dans la phase pseudo-gazeuse (G) lorsque les molécules sont suffisamment espacées pour que les interactions de van der Waals soient négligeables (Ulman, A., 1991). Dans ce cas, la pression de surface mesurée est très petite ou nulle. Ainsi, les chaînes hydrophobes des lipides sont désordonnées et inclinées par rapport à l'interface.

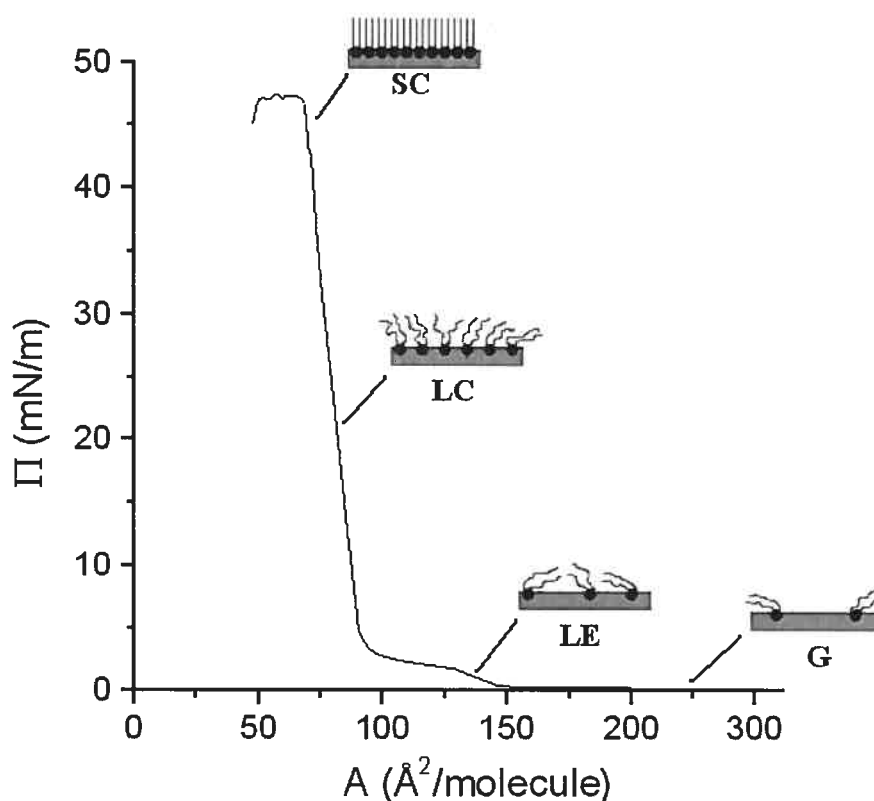


Figure 1.11 : Schéma d'un isotherme de compression (Π -A) et les phases d'une monocouche de phospholipide (Ulman, A., 1991). SC, LC, LE et G sont, respectivement, les phases solide condensé, liquide condensé, liquide étendu et pseudo-gazeuse.

Lorsque la barrière est mise en marche et que la compression progresse, les molécules sont de plus en plus rapprochées. À un certain point, elles n'ont d'autre choix que d'interagir ensemble. C'est alors que la pression de surface augmente subtilement et que la monocouche se retrouve en phase liquide étendu (LE). Dans cette phase, les lipides interagissent ensemble, mais leurs chaînes hydrophobes ne sont pas encore redressées parallèlement à la normale de l'interface. Elles ont encore beaucoup d'espace et la monocouche demeure très compressible. Si la compression est soutenue, un plateau est obtenu. Cette zone de l'isotherme correspond à la transition de la phase LE à la phase liquide condensé (LC).

Comme la phase LE n'est pas toujours détectable, ce plateau semble souvent être la continuité de la phase gazeuse. Suite à ce plateau, une abrupte augmentation de la pression de surface indique que la phase LC est atteinte. Plus les chaînes des lipides sont rigides, plus cette augmentation est marquée. La phase LC est caractérisée par un rapprochement important des molécules. Les interactions intermoléculaires sont encore plus importantes que dans la phase LE et les chaînes sont forcées de demeurer redressées par rapport à l'interface. La monocouche demeure compressible dans cette phase.

À un certain niveau de compression de la phase LC, l'aire moléculaire devient limitée par la taille des têtes polaires et les chaînes hydrophobes deviennent ordonnées et redressées par rapport à l'interface. La monocouche atteint alors la phase solide condensé (SC). La compressibilité étant considérablement réduite, une diminution de l'aire interfaciale entraîne rapidement à la déstabilisation de la monocouche. La rupture de la monocouche est caractérisée par des fluctuations irrégulières de la pression de surface. Les lipides se réorganisent en raison du manque d'espace et forment, par exemple, des multicouches.

L'isotherme Π -A d'une monocouche permet de déterminer l'aire moléculaire limite A_{lim} et la pression de rupture Π_c (l'indice "c" est pour *collapse*). L'aire moléculaire limite correspond à l'aire moyenne occupée par une molécule dans la monocouche stable et à l'équilibre. Il est possible de déterminer cette valeur en extrapolant une régression linéaire tangente à la section de l'isotherme où la pression est très élevée (**Figure 1.12**). La valeur de A_{lim} correspond à la valeur de A pour laquelle Π est nulle selon cette régression linéaire. La pression de rupture Π_c correspond à la pression de surface maximale que la monocouche peut supporter. Cette valeur dépend de la température et de la vitesse de compression. L'aire moléculaire qui correspond à cette pression est l'aire minimale que peut occuper une molécule.

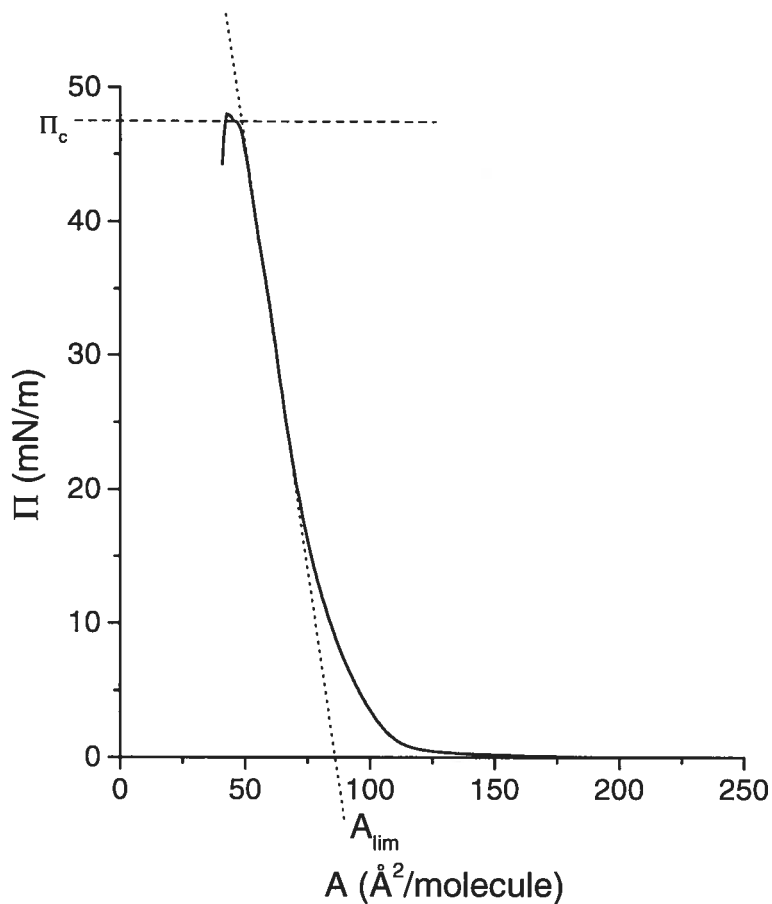


Figure 1.12 : Schéma d'un isotherme de compression et les informations qu'il fournit. L'isotherme correspond au trait plein. Les traits pointillés sont tracés sur l'isotherme afin de déterminer A_{lim} (···) et Π_c (---).

1.6.4 A ou Π constante (Π -t ou A-t)

Les deux autres modes d'acquisition de la balance Langmuir, soit Π en fonction du temps et A en fonction du temps, mènent à des informations similaires. Ces deux modes permettent de détecter une adsorption ou une extraction de molécules à l'interface. Pour obtenir une monocouche qui mime les

propriétés d'une membrane cellulaire, il est préférable de fixer la pression de surface. La valeur de Π choisie doit refléter la membrane à imiter. Dans la présente étude, des monocouches de POPC ont été utilisées. Or, il est connu que l'aire moléculaire du POPC est de 68 \AA^2 (Beschiaschvili and Seelig, J., 1990). L'enregistrement de l'isotherme Π -A permet de déterminer quelle pression de surface utiliser afin d'obtenir l'aire moléculaire désirée. Cette pression de surface devrait être d'environ 30-35 mN/m puisqu'il est généralement admis qu'elle correspond à la pression caractéristique des membranes biologiques (Marsh, D., 1996).

1.7 Problématique

Le but principal de ce projet était d'étudier les interactions entre la BSP-A1/A2 et les membranes lipidiques. D'abord, il s'agissait de caractériser l'association de la protéine à divers systèmes lipidiques en utilisant le titrage calorimétrique isotherme (ITC). Nous désirions déterminer l'effet des propriétés de la bicouche sur l'association de la protéine et examiner s'il était possible d'établir une interaction sélective entre certains lipides et la protéine. Ensuite, l'intégrité des membranes suite à leur interaction avec la protéine a été étudiée à l'aide de la technique des monocouches de Langmuir et de la microscopie de fluorescence.

La composition lipidique des membranes affecte l'affinité de la BSP-A1/A2 pour ces dernières (Greube et al., 2001; Ramakrishnan et al., 2001; Thomas et al., 2003; Swamy et al., 2002). Des expériences ITC ont été menées afin d'étudier l'interaction de la BSP-A1/A2 avec des LUV, ainsi qu'avec des segments de phospholipides solubles en phase aqueuse. Dans un premier temps, l'effet de la tête polaire des lipides a été étudié en comparant l'interaction de la BSP-A1/A2 avec des LUV de POPC et avec des LUV de POPC contenant 30% (mol/mol) de POPE ou de POPG. Deuxièmement, l'effet de la présence du cholestérol a été observé en comparant les données pour des LUV de POPC et

celles contenant 30% (mol/mol) de cholestérol. Cette partie du projet de recherche visait à compléter les expériences préliminaires ITC pour ces mélanges lipidiques effectuées par Danny Lassiseraye. Celles-ci montrent que l'ordre d'affinité de la protéine (à 37 °C) pour ces systèmes est le suivant : POPC/POPE > POPC/POPG > POPC >> POPC/Chol (Lassiseraye, D., 2006). Il est très intéressant que l'incorporation de 30% (mol/mol) de POPE dans les LUV de POPC contribue à améliorer l'affinité de la protéine car les études de la littérature suggèrent en fait l'opposé. Les informations reportées sur l'interaction de la BSP-A1/A2 avec les membranes contenant de la PE suggèrent plutôt que la protéine a moins d'affinité avec ce type de lipide qu'avec les PC (Ramakrishnan et al., 2001; Müller et al., 1998; Greube et al., 2001; Thomas et al., 2003). Il faut cependant noter que ces dernières ont été réalisées avec des bicouches contenant une quantité très limitée (1%) de PE (en plus marquée avec un nitroxyde au niveau de la chaîne acyle) ou des bicouches contenant aussi une quantité considérable (30% mol/mol) de cholestérol. En raison de l'aspect controversé des résultats obtenus par Danny Lassiseraye, ils doivent être très bien validés. Malheureusement, les conclusions de Danny Lassiseraye découlent d'expériences effectuées en duplicata ($n = 2$), qui ne sont pas toujours indépendantes. De plus, ΔH_{mol} doit être déterminé en injectant des protéines dans une cellule contenant un large excès de lipides afin d'assurer la liaison complète des protéines injectées. Il a été constaté, a posteriori, que les conditions utilisées lors de ces études n'assuraient pas une liaison complète, menant à une inexactitude des valeurs de ΔH_{mol} , ce qui a des répercussions sur les isothermes. Ainsi, cette partie du présent projet visait à reproduire ces expériences dans des conditions optimales afin d'obtenir des résultats plus représentatifs de la réalité et valider les observations préliminaires obtenues par Danny Lassiseraye. La seconde partie de l'étude ITC a été consacrée à l'étude de l'interaction de la protéine avec des segments solubles de phospholipides. La technique utilisée a permis d'obtenir l'enthalpie molaire de liaison et la constante d'association de chaque système. Ces données ont permis d'en apprendre davantage au sujet des interactions qui régissent l'association de la BSP-A1/A2 aux membranes.

Quelques études démontrent une extraction des lipides par la protéine (Thérien et al., 1998; Thérien et al., 1999; Davis, 1981) et certaines suggèrent qu'il y a formation de petites particules composées de protéine et de lipides (Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997; Gasset et al., 2000). Ainsi, il semble que la BSP-A1/A2 porterait atteinte à l'intégrité des membranes. Les micrographes obtenus par Lafleur et Edwards (**Figure 1.7**) montrent aussi clairement que la protéine vient changer la morphologie des assemblages lipidiques. Afin de caractériser davantage ces déformations, deux séries d'expériences ont été effectuées. D'abord, la microscopie de fluorescence a permis de comparer la forme de vésicules de POPC en absence et en présence de BSP-A1/A2. En incorporant une faible proportion de phosphocholine marquée d'un fluorophore, les vésicules formées fût observables en microscopie de fluorescence. Ainsi, les assemblages lipidiques ont pu être visualisés, ainsi que les changements morphologiques induits par la BSP-A1/A2. Ensuite, la technique des monocouches de Langmuir a été utilisée pour déterminer si la protéine perturbe une monocouche de POPC. L'effet du cholestérol a été évalué en effectuant une expérience analogue pour une monocouche de POPC contenant 30% (mol/mol) de cholestérol. La technique des monocouches de Langmuir a permis de détecter les variations de l'aire occupée par les phospholipides de la monocouche, pour une pression de surface fixe. À partir de ces observations, il a été possible de discuter des perturbations induites par la BSP-A1/A2 suite à son association aux membranes.

Chapitre 2 : Étude calorimétrique des interactions entre la BSP-A1/A2 et les membranes lipidiques

2.1 Introduction

Cette partie de l'étude menée sur les interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides visait à déterminer comment la composition lipidique influence l'affinité de la protéine pour les membranes. Les travaux préliminaires en ITC effectués par Danny Lassiseraye ont démontré que l'association de la protéine aux membranes peut être décrite, à la fois, par des mécanismes endothermique et exothermique (Lassiseraye, D., 2006). L'importance relative de ces deux processus serait affectée par la température ainsi que la composition des membranes. Lors de la présente étude, le titrage calorimétrique isotherme (ITC) a été utilisé afin de caractériser thermodynamiquement l'interaction entre la protéine et les lipides à 37 °C. Cette technique a permis d'obtenir les données thermodynamiques et l'affinité relative de la protéine pour différents systèmes lipidiques. En modulant les propriétés de la membrane, il a été possible d'identifier ses effets sur l'association de la protéine. Notamment, l'effet de POPE, de POPG et du cholestérol dans la membrane de POPC a été examinée.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Matériel

Le MOPS (acide 3-Morpholinopropanesulfonique), le cholestérol et la phosphoéthanolamine ont été obtenus de Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). La POPC, la POPE et le POPG ont été obtenues de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). La phosphocholine a été obtenue de TCI (Portland, OR, USA). La BSP-A1/A2 a été isolée et purifiée selon une méthode établie (Manjunath and

Sairam, M.R., 1987; Manjunath et al., 1987). Toutes les solutions de protéines et suspensions lipidiques ont été préparées dans le tampon MOPS 10 mM, dans l'eau ultra-pure ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), dont le pH a été ajusté à 7,4. Le pH des solutions de protéines a été mesuré et réajusté au besoin avec une solution de NaOH.

2.2.2 Préparation des LUV

Afin d'obtenir les différents mélanges lipidiques, des quantités appropriées de lipides ont été dissoutes dans un mélange de benzène/méthanol (90/10 (vol/vol)). Ces solutions ont ensuite été lyophilisées. Les poudres résultantes ont été hydratées par la solution tampon MOPS (10 mM, pH 7,4). Afin d'assurer une bonne hydratation des lipides, les suspensions ont été soumises à 5 cycles gel-dégel (de l'azote liquide à $\sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$). Des vésicules unilamellaires (LUV) ont été obtenues en extrudant les suspensions lipidiques à travers des filtres de polycarbonate, possédant des pores de 100 nm de diamètre, à l'aide d'une extrudeuse manuelle (Avestin, Ottawa, ON). La taille des LUV a été mesurée à l'aide d'un appareil de diffusion quasi-élastique de la lumière Coulter N4 Plus (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) couplé à un autocorrélateur (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). La concentration phospholipidique exacte de toutes les suspensions a été obtenue à l'aide de la méthode de Fiske-Subbarow (Fiske and Subbarow, Y., 1925).

2.2.3 Paramètres ITC

Les expériences ITC ont été menées en utilisant un calorimètre MicroCal VP-ITC (MicroCal inc., Northhampton, MA, USA). L'analyse des résultats a été effectuée avec le logiciel Origin™ (version 5.0) fournit par MicroCal. Les valeurs reportées et les écarts-types sont obtenus à partir de triplicatas.

Typiquement, la cellule du calorimètre (1,4527 ml) était remplie de suspension de lipides (0,5-20 mM) et la seringue contenait la solution de protéine (0,1-0,2 mM ; 1,5-3 mg/ml). Les protéines étaient injectées dans la cellule tout en maintenant une agitation de 300 rpm. La chaleur attribuable à la dilution de chaque réactif a été évaluée en effectuant des expériences contrôles. Ces dernières ont été menées dans des conditions identiques aux titrages, mais en remplaçant un des réactifs par la solution tampon. L'enthalpie reliée à la dilution de la protéine, dans les conditions utilisées, s'est avérée négligeable. Cependant, celle des lipides ne l'étant pas, elle a été évaluée pour chaque expérience puis soustraite de l'enthalpie mesurée lors des titrages.

2.3 Résultats

2.3.1 Interaction entre la BSP-A1/A2 et les membranes de POPC

Le thermogramme présenté à la **Figure 2.1** illustre le titrage en présence d'un excès de lipides qui permet de déterminer la valeur de ΔH_{mol} . L'aire des pics est sensiblement la même, indiquant que toutes les protéines injectées se liaient. Il est à noter que le volume de la première injection est souvent inexact, surtout lorsqu'il s'agit de petits volumes. Ceci se traduit par une variation artificielle de la surface de ce pic. Ce type d'expérience a permis de déterminer que l'enthalpie molaire de liaison de la BSP-A1/A2 aux vésicules de POPC est de (-70 ± 2) kJ/mol (**Tableau III**).

Une courbe de titrage caractérisant la liaison de la protéine aux LUV de POPC a été obtenue (**Figure 2.2**). Lors de cette expérience, les concentrations des deux réactifs ont été choisies de façon à ce qu'il y ait une saturation de la

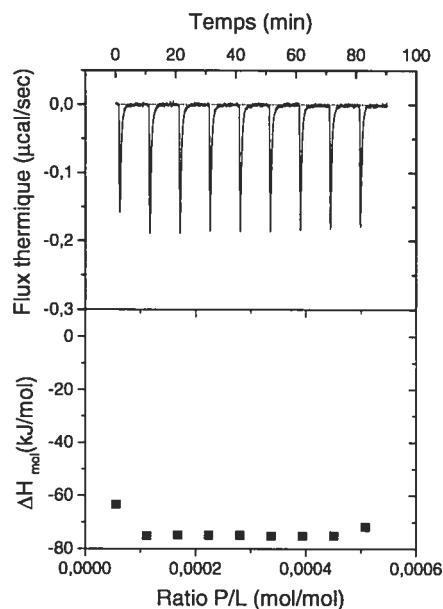


Figure 2.1 : Allure typique d'une expérience ITC, en excès de lipides, permettant de déterminer l'enthalpie molaire de liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C. Chaque pic correspond à une injection de 5 µL de la solution de protéine (0,1 mM) à la suspension de lipides (6,2 mM).

bicouche. Pour ce système lipidique, il y a saturation de la membrane à (16 ± 1) lipides par protéine liée (**Tableau III**), considérant que seul le feuillet externe de la membrane est accessible aux protéines. Une faible contribution endothermique a été observée de façon reproductible pour tous les systèmes lipidiques étudiés ici (POPC, POPC/POPE, POPC/POPG et POPC/Chol). Cette contribution est mesurée après le pic exothermique. Les travaux de Danny Lassiseraye ont démontré que le processus endothermique prend de l'importance lorsque la température passe de 37 à 20 °C et serait attribuable à une association différente de la protéine aux membranes (Lassiseraye, D., 2006). La présente étude se concentre sur les interactions ayant lieu à 37 °C, où la contribution exothermique domine largement dans les thermogrammes. Seule cette contribution sera considérée.

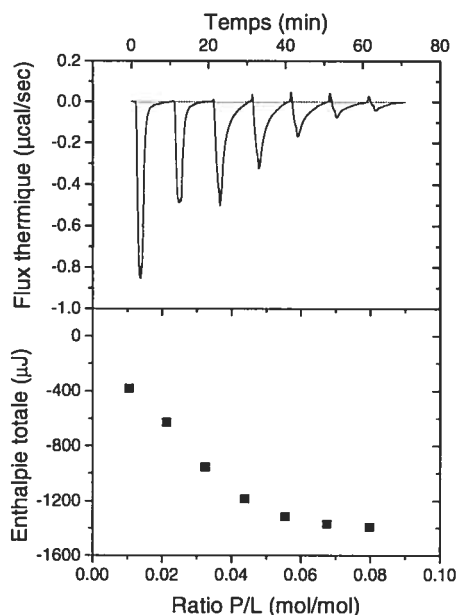


Figure 2.2 : Courbe de titrage ITC typique pour la liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C. La section supérieure montre la variation de chaleur correspondant à chaque injection (40 µL) de la solution de protéine (0,2 mM) à la suspension de lipides (0,53 mM). La section inférieure indique l'enthalpie totale calculée.

L'isotherme de partage qui découle de cette expérience est présenté à la **Figure 2.3A**. La courbure de cet isotherme montre que, dans les conditions du titrage, il n'est pas possible d'évaluer une seule constante de partage (K_p) de la protéine entre la phase aqueuse et la pseudo-phase lipidique qu'offre la membrane. Une telle courbure de l'isotherme de partage a déjà été observée pour les interactions lipide-protéine et elle a été attribuée à la variation de la densité de charge sur la membrane (Seelig, 1997; Heerklotz and Seelig, J., 2000). Dans le modèle développé par Seelig, la charge effective de la protéine, Z_p , est un paramètre ajustable de la simulation (**Équation 1.10**). La **Figure 2.3** illustre l'effet de la valeur de Z_p sur la linéarité de l'isotherme décrivant l'interaction de la BSP-A1/A2 avec les LUV de POPC.

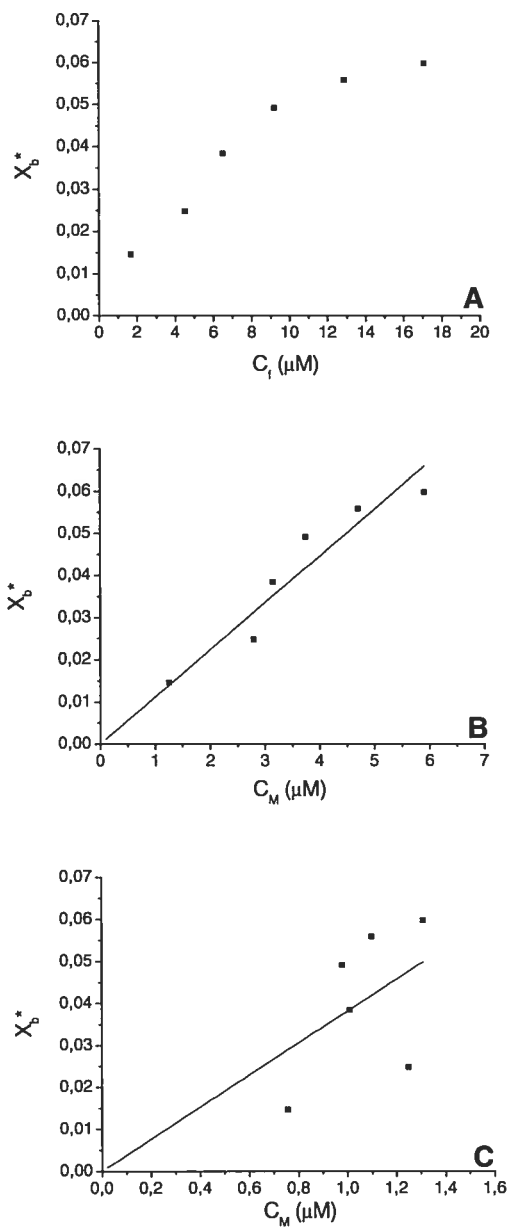


Figure 2.3 : Effet de Z_p sur l'isotherme décrivant la liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C. (A) Isotherme de partage (pour $Z_p = 0$ i.e. $C_M = C_f$). (B) Isothermes corrigés selon la théorie de Gouy-Chapman considérant $Z_p = +0,6$. (C) $Z_p = +1,0$.

Tableau III : Enthalpie molaire de liaison et saturation de la membrane pour l'association de la BSP-A1/A2 aux différents systèmes lipidiques à 37 °C.

Système	ΔH_{mol} (kJ/mol)	Saturation (phospholipides/protéine liée)
POPC	-70 ± 2	16 ± 1
POPC/POPE (7/3)	-72 ± 1	26 ± 2
POPC/POPG (7/3)	-87 ± 7	11 ± 1
POPC/Chol (7/3)	-58 ± 1	172 ± 15

Le test statistique du khi carré (χ^2) entre les données et la meilleure droite a permis d'évaluer la valeur Z_P permettant l'obtention de l'isotherme le plus linéaire qui passe par l'origine (**Figure 2.4**). La pente de l'isotherme obtenu avec cette charge correspondait à la constante de partage K_P^{int} , décrivant l'équilibre près de l'interface. Pour un système donné, les valeurs de Z_P et de K_P^{int} ont été déterminées indépendamment pour chacune des trois expériences indépendantes.

L'application de la théorie de Gouy-Chapman, considérant une valeur de $Z_P = 0,6$ pour cette expérience en particulier, a permis de redresser l'isotherme de partage de façon optimale. Effectivement, pour cette valeur de Z_P , la valeur de χ^2 était minimale (**Figure 2.4A**). En s'éloignant de la charge effective de la protéine optimale, l'isotherme diverge de la linéarité (**Figure 2.3C**).

Il est à noter que X_b^* et C_f ne sont pas affectés par la variation de Z_P , seul C_M l'est (**Figure 2.3**): lorsque la charge augmente, C_M diminue. À titre d'exemple, suite à la première injection de protéine dans la suspension de POPC, la valeur de C_M est de $1,68 \mu\text{M}$ pour $Z_P=0$ et $0,76 \mu\text{M}$ pour $Z_P=1$. Cet effet est encore plus marqué lorsque le titrage progresse i.e. la charge accumulée à la surface est grande. Par exemple, suite à la cinquième injection de protéine, la valeur de C_M est de $17,1 \mu\text{M}$ pour $Z_P=0$ et $1,31 \mu\text{M}$ pour $Z_P=1$.

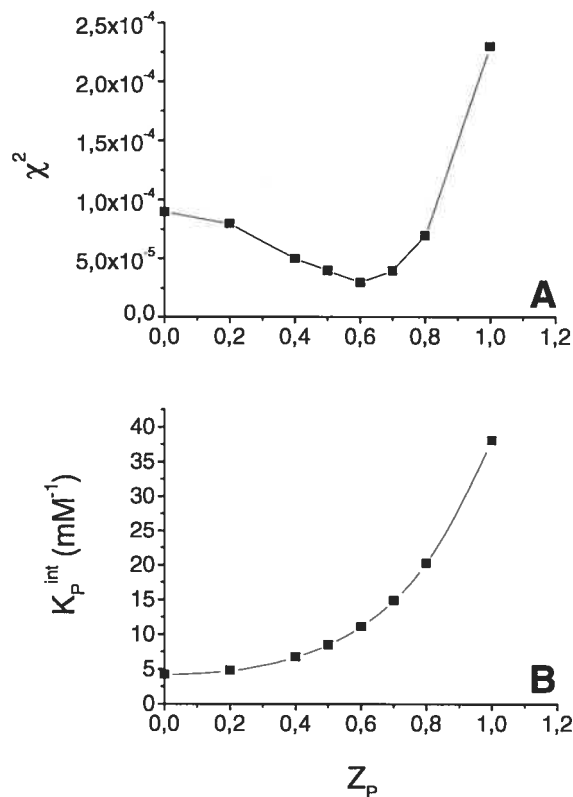


Figure 2.4 : Effet de Z_p sur le modèle de Gouy-Chapman pour l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les LUV de POPC à 37 °C. (A) Effet de la charge sur la qualité de l'isotherme corrigé. (B) Effet de la charge sur la valeur de K_p^{int} .

Le minimum de Z_p se trouve dans un puit relativement large (**Figure 2.4**). Ceci a un impact sur les valeurs et incertitudes de K_p^{int} . Près de la valeur optimale de Z_p (0,6 pour cette expérience), une faible variation de la charge de $\pm 0,1$ ($\pm 17\%$) entraîne une importante variation de K_p^{int} , soit de $\pm 30\%$ pour cette expérience en particulier. Cet effet de Z_p sur K_p^{int} s'est avéré de la même ampleur pour les trois expériences indépendantes décrivant l'association de la protéine à ce système lipidique ainsi qu'aux autres systèmes étudiés. Pour une variation d'environ 20% de la charge, l'ampleur de l'effet sur K_p^{int} était similaire ($\pm 30-40\%$). Dans le cas de POPC/POPG (7/3), les interactions électrostatiques sont plus importantes parce que, en plus de la répulsion inter-protéine, ce modèle considère des interactions entre les lipides chargés et les protéines. Pour ce système,

l'incertitude trouvée pour la valeur optimale de Z_P , $\pm 27\%$, est plus grande que pour les autres systèmes. Les paramètres Z_P et K_P^{int} étant intimement reliés, une faible variation du premier entraîne des variations relativement grandes du second. Ceci explique la grande imprécision de la valeur de K_P^{int} obtenue pour POPC/POPG (7/3).

Les valeurs moyennes obtenues en appliquant la théorie de Gouy-Chapman sont présentées dans le **Tableau IV**. Pour l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les LUV de POPC, la valeur moyenne de Z_P obtenue est $(0,6 \pm 0,1)$ et K_P^{int} est de $(14 \pm 5) \text{ mM}^{-1}$. L'isotherme de Scatchard décrivant la liaison de la protéine aux LUV de POPC est présenté à la **Figure 2.5**. Cet isotherme permet de déterminer la constante d'affinité (K) entre la BSP-A1/A2 et la membrane, ainsi que le nombre de lipides qui sont associés à la liaison d'une protéine (n_{LP}), ou en d'autres mots, le nombre de lipides par site. Le point correspondant à la seconde injection est un peu à l'écart de la droite obtenue pour une raison inconnue. Cependant, ce point n'a pas été rejeté puisque cette déviation a été observée pour tous les réplicats indépendants ($n = 3$). La linéarité est représentée par un coefficient de corrélation d'environ 0,8. Ce modèle a permis de déterminer que la constante d'affinité de la protéine pour les LUV de POPC est de $(103 \pm 21) \text{ mM}^{-1}$ et que le nombre de lipides par site est de (10 ± 1) (**Tableau V**).

Tableau IV : Constantes de partage, énergie libre et charges effectives de la protéine selon le modèle de Seelig pour l'association de la BSP-A1/A2 aux différents systèmes lipidiques à 37 °C.

Système	K_P^{int} (mM^{-1})	ΔG_{int} (kJ/mol)	K_{TOT} (mM^{-1})	Z_P
POPC	14 ± 5	-35 ± 1	-	$0,6 \pm 0,1$
POPC/POPE (7/3)	152 ± 121	-40 ± 3	-	$1,5 \pm 0,3$
POPC/POPG (7/3)	$0,08 \pm 0,1$	-20 ± 4	23 ± 5	$1,1 \pm 0,3$
POPC/Chol (7/3)	$0,9 \pm 0,3$	-28 ± 1	-	$1,7 \pm 0,3$

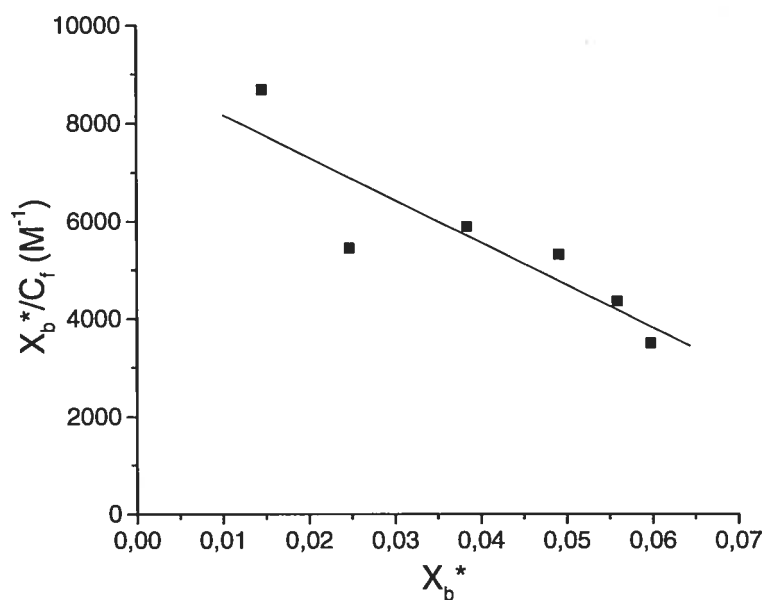


Figure 2.5 : Isotherme de Scatchard décrivant la liaison de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC à 37 °C.

Tableau V : Constantes d'affinité et nombres de lipides par protéine selon le modèle de Scatchard pour l'association de la BSP-A1/A2 aux différents systèmes lipidiques à 37 °C.

Système	K (mM^{-1})	$n_{L/P}$ lipides/protéine
POPC	103 ± 21	10 ± 1
POPC/POPE (7/3)	463 ± 173	23 ± 2
POPC/POPG (7/3)	148 ± 49	7 ± 2
POPC/Chol (7/3)	66 ± 20	92 ± 21

2.3.2 Effet de la tête polaire

Afin de caractériser l'effet de la tête polaire des phospholipides, 30% (mol/mol) de POPE ou de POPG ont été incorporés dans des membranes de POPC. Des expériences analogues à celles présentées ci haut ont été menées pour ces systèmes lipidiques. D'abord, l'enthalpie molaire de liaison et la saturation de la membrane ont été obtenues pour chaque système (**Tableau III**). Ensuite, les titrages de la membrane (**Tableau III**) ont été obtenus (**Figure 2.6A** et **E**). À partir de ces titrages, les isothermes de partition ont été obtenus (**Figure 2.6B** et **F**). Encore une fois, le modèle du partage de la protéine entre deux phases, caractérisé par une seule constante d'équilibre, serait inapproprié pour décrire convenablement les données qui présentent une courbure de l'isotherme.

La correction des isothermes selon la théorie de Gouy-Chapman permet d'obtenir une meilleure linéarité (**Figure 2.6C** et **G**). Ce modèle a permis de déterminer que les valeurs optimales de Z_P et de K_P^{int} sont de $(1,5 \pm 0,3)$ et de $(152 \pm 121) \text{ mM}^{-1}$ pour l'association de la protéine aux LUV de POPC/POPE (7/3) (**Tableau IV**). Pour les membranes de POPC/POPG (7/3), ces valeurs sont de $(1,1 \pm 0,3)$ et de $(0,08 \pm 0,11) \text{ mM}^{-1}$, respectivement (**Tableau IV**). La constante de partage qui décrit les interactions de longue portée pour ce système, K_{TOT} , a aussi été déterminée (**Équation 1.12**) et elle est de $(23 \pm 5) \text{ mM}^{-1}$ (**Tableau IV**).

L'application du modèle de Scatchard afin de décrire l'association de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC/POPE (7/3) et de POPC/POPG (7/3) a conduit à des isothermes de Scatchard linéaires (**Figure 2.6D** et **H**). Les valeurs de K et de $n_{L/P}$ obtenues pour l'association de la protéine aux LUV de POPC/POPE sont de $(463 \pm 173) \text{ mM}^{-1}$ et (23 ± 2) , respectivement. Pour les LUV de POPC/POPG, ces valeurs sont de $(148 \pm 49) \text{ mM}^{-1}$ et (7 ± 2) .

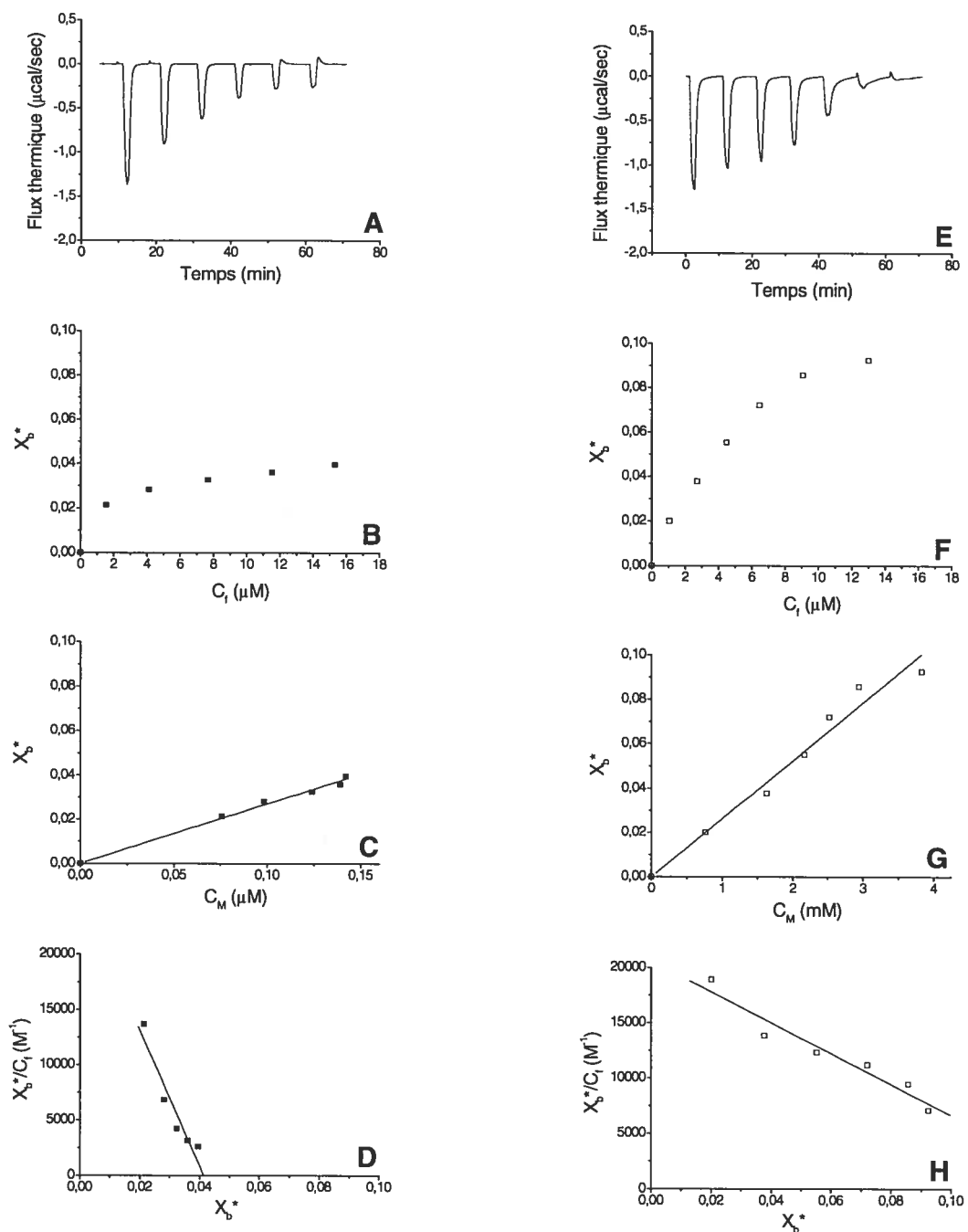


Figure 2.6 : Titrages et isothermes décrivant l'association de la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC/POPE (7/3) et aux LUV de POPC/POPG (7/3) à 37 °C. Titrages, isothermes de partage, isothermes de Gouy-Chapman et isothermes de Scatchard pour POPC/POPE (7/3) (■; A-D respectivement) et pour POPC/POPG (7/3) (□; E-H respectivement).

2.3.3 Effet du cholestérol

Afin de caractériser l'effet de la présence de cholestérol dans les membranes de phosphatidylcholine, 30% (mol/mol) de ce lipide ont été incorporés dans les membranes de POPC. Des expériences analogues à celles décrites ci haut ont été effectuées pour ce système. L'enthalpie molaire de liaison associée à l'interaction de la protéine aux membranes de POPC/Chol (7/3) est de (-58 ± 1) kJ/mol et la membrane est saturée à (172 ± 15) phospholipides par protéine liée (**Tableau III**). L'allure typique des titrages et des isothermes obtenus pour ce système sont présentés à la **Figure 2.7**. Comme pour les autres systèmes lipidiques, le modèle de partition mène à un isotherme présentant une certaine courbure (**Figure 2.7B**). L'application de la correction selon la théorie de Gouy-Chapman permet d'améliorer considérablement la linéarité de l'isotherme (**Figure 2.7C**). Ce modèle a permis de déterminer que les valeurs de Z_p et K_p^{int} pour ce système lipidique sont de $(1,7 \pm 0,3)$ et de $(0,9 \pm 0,3)$ mM^{-1} , respectivement (**Tableau IV**). Le modèle de Scatchard permet aussi de bien décrire l'association de la protéine aux LUV de POPC/Chol (7/3) (**Figure 2.7D**). Ce modèle a permis d'évaluer que les valeurs de K et de n_{LP} correspondant à ce système sont de (66 ± 20) mM^{-1} et (92 ± 21) , respectivement (**Tableau V**).

2.3.4 Interaction entre la BSP-A1/A2 et les substrats solubles

Des expériences ITC ont été effectuées afin d'étudier l'importance de la structure moléculaire des phospholipides dans l'interaction entre la BSP-A1/A2 avec les membranes. L'affinité de la protéine pour différents segments de phospholipides est examinée en titrant de petites molécules solubles représentatives de groupements fonctionnels lipidiques avec une solution de protéine. Dans un premier temps, l'interaction de la BSP-A1/A2 avec la

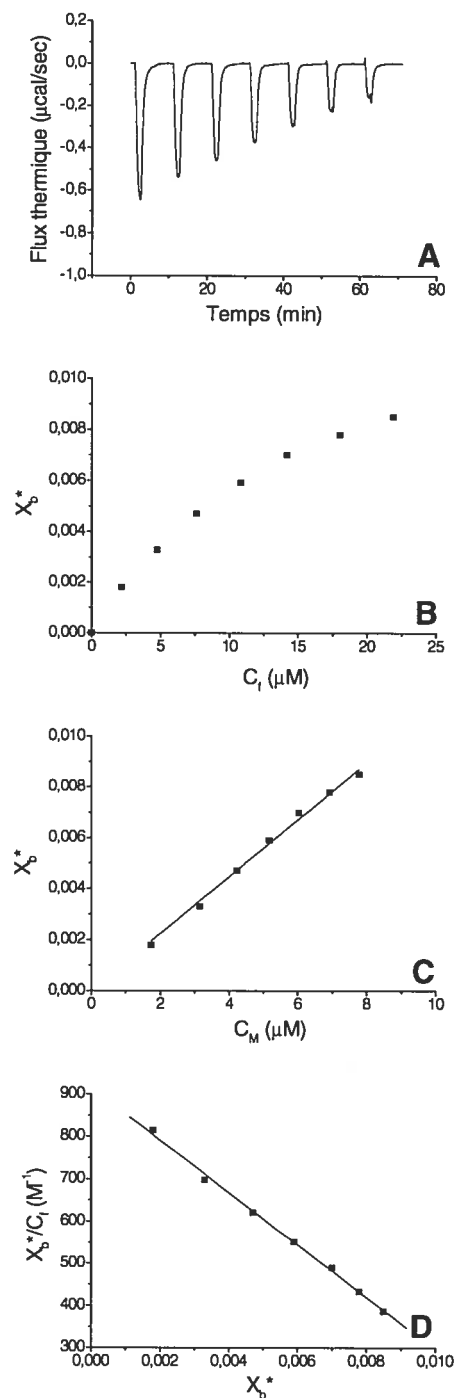


Figure 2.7 : Titrage et Isothermes décrivant l'interaction entre la BSP-A1/A2 aux LUV de POPC/Chol (7/3) à 37 °C. **(A)** Titrage typique. **(B)** Isothermes de partage. **(C)** Isotherme corrigé selon la théorie de Gouy-Chapman. **(D)** Isothermes de Scatchard.

phosphocholine a été étudiée. L'enthalpie molaire de liaison a été déterminée de façon analogue à celle pour les membranes et elle est de (-92 ± 3) kJ/mol (**Figure 2.8**).

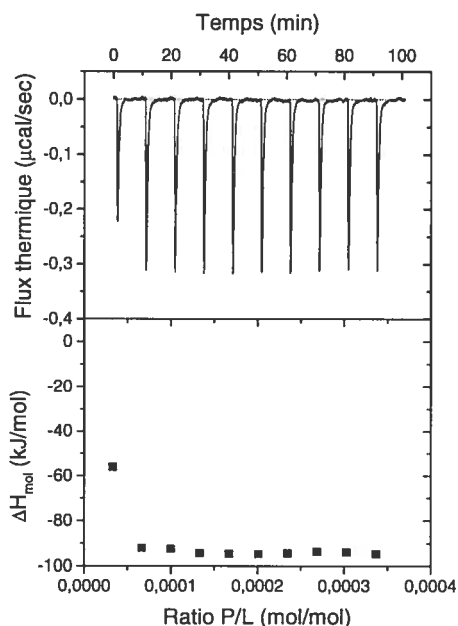


Figure 2.8 : Allure typique d'une expérience ITC permettant de déterminer l'enthalpie molaire de liaison de la BSP-A1/A2 à la phosphocholine à 37 °C. Chaque pic correspond à une injection de 5 μL de la solution de protéine (0,1 mM) à la solution de choline (10,38 mM).

La courbe de titrage typique caractérisant l'interaction entre la phosphocholine et la BSP-A1/A2 est présentée à la **Figure 2.9**. Le modèle de partition est inadéquat pour décrire les interactions entre la protéine et les substrats solubles car ces derniers ne constituent pas une phase distincte du milieu aqueux. Les données ont été analysées avec le modèle de Scatchard. Il a permis de déterminer que l'interaction entre la BSP-A1/A2 et la phosphocholine est décrite par une constante d'affinité K de (83 ± 17) mM^{-1} et une valeur de n_{LP} de $(4,4 \pm 0,2)$.

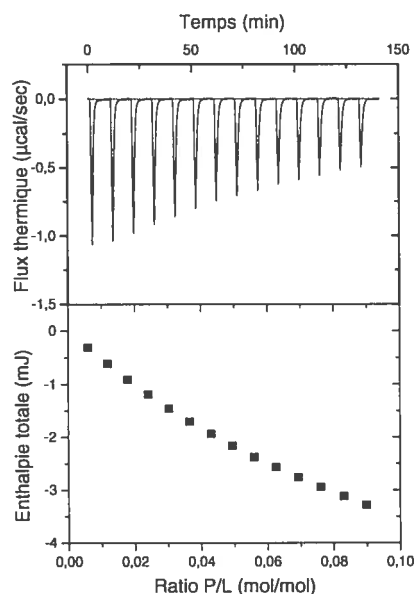


Figure 2.9 : Courbe de titrage ITC typique pour la liaison de la BSP-A1/A2 à la phosphocholine à 37 °C. La section supérieure montre la variation de chaleur correspondant à chaque injection (20 µL) de la solution de protéine (0,2 mM) à la suspension de phosphocholine (0,47 mM). La section inférieure indique l'enthalpie totale calculée.

L'interaction de la BSP-A1/A2 avec la phosphoéthanolamine a aussi été investiguée. Pour ce substrat soluble, aucune enthalpie de liaison significative n'a été mesurée à 37 °C. Les volumes d'injections (5 à 20 µL) et les concentrations de chaque réactif (0,075 à 0,2 pour BSP-A1/A2 ; 7 à 20 mM pour PE) ont été augmentés afin d'amplifier le signal, mais en vain. Chaque fois, le signal mesuré était du même ordre de grandeur que celui des contrôles de dilution de chaque réactif (résultats non montrés).

2.4 Discussion

2.4.1 Interactions entre la BSP-A1/A2 et les membranes

L'association de la BSP-A1/A2 aux membranes lipidiques de POPC, de POPC/POPE (7/3), de POPC/POPG (7/3) et de POPC/Chol (7/3) est un phénomène essentiellement exothermique à 37 °C. L'enthalpie molaire de liaison est affectée par la composition lipidique des membranes (**Tableau III**). L'ordre obtenu selon ce paramètre est PC/PG > PC ~ PC/PE > PC/Chol. Ainsi, l'interaction de la BSP-A1/A2 avec les membranes contenant du POPG est celle la plus favorisée enthalpiquement. Ceci est cohérent avec des interactions électrostatiques favorables entre la membrane chargée négativement et les nombreux résidus chargés positivement de la protéine. D'autre part, la présence de 30% (mol/mol) de cholestérol dans une membrane de PC défavorise l'interaction entre la protéine et la membrane. Le cholestérol augmente notamment la rigidité des membranes et rend l'empilement des chaînes plus compact (Douliez et al., 1996; Li et al., 2001; Brown and London, E., 1998). Ceci pourrait être défavorable à l'association de la protéine à la bicouche. D'ailleurs, quelques études ont démontré une diminution de l'affinité de peptides pour les membranes contenant du cholestérol. Notamment, l'insertion de la mélittine et de la nisine dans les membranes de PC serait réduite par la présence de cholestérol (Benachir et al., 1997; El Jastimi et al., 1999). Finalement, la présence de la POPE dans les membranes de POPC n'affecte pas significativement l'enthalpie de liaison de la protéine.

Les valeurs de ΔH_{mol} obtenues (**Tableau III**) sont semblables à celles reportées pour l'interaction de la BSP-A1/A2 avec la phosphorylcholine et la lyso-PC, soit -79,8 kJ/mol et -73 kJ/mol respectivement (Anbazhagan and Swamy, M.J., 2005). Ceci suggère que les interactions associées à l'enthalpie de liaison impliquent principalement les têtes polaires. Cependant, une valeur de ΔH_{mol} de

7,08 kJ/mol a été obtenue par SPR pour des membranes de DMPC contenant 30 % mol/mol de cholestérol (Thomas et al., 2003). Cette étude montre que la liaison est un processus endothermique entre 5 et 21 °C (les mesures n'ont pas été effectuées à des températures plus élevées). Or, Danny Lassiseraie a démontré que l'enthalpie de liaison associée à l'interaction de la BSP-A1/A2 avec les membranes dépend de la température (Lassiseraie, D., 2006). Effectivement, pour les membranes de POPC/Chol (7/3), un processus exothermique se produit à 37 °C, alors qu'un processus endothermique a lieu à 20 °C. Cette dépendance thermique est cohérente avec l'obtention d'un ΔH_{mol} positif par Thomas et al (Thomas et al., 2003).

Le nombre de lipides associés à une protéine liée a été évalué considérant que seul le feuillet externe de la bicouche est accessible. Pour les vésicules de POPC, il y avait saturation de la membrane pour un ratio lipide/protéine de 16 (**Tableau III**). Cette valeur s'approche de celles reportées dans la littérature pour des membranes de phosphatidylcholine, soit d'environ 10-12 lipides/protéine (Ramakrishnan et al., 2001; Gasset et al., 2000; Müller et al., 1998). Un tel ratio lipide/protéine correspondrait à un recouvrement total de la surface des vésicules par la protéine (Ramakrishnan et al., 2001). Pour les membranes contenant 30% de POPG, le ratio lipide/protéine de 11 était similaire à celui des membranes de POPC pure. Cependant, pour les membranes de POPC/POPE (7/3) et de POPC/Chol (7/3), des ratios plus élevés ont été obtenus. Les membranes contenant de la POPE étaient saturées de protéine à un ratio de 26 phospholipides/protéine, soit un peu plus élevé que celui pour les membranes de POPC pure. Si on ne considère que les phosphatidylcholines de ce mélange, un ratio PC/protéine de 18 est obtenu. Cette valeur s'approche de celle obtenue pour les membranes de PC pures. Quant aux membranes contenant du cholestérol, elles étaient saturées à un ratio beaucoup plus élevé, soit 172 PC/protéine. Ainsi, il y avait saturation avant que la membrane soit complètement recouverte de protéine. Non seulement le ΔH_{mol} associé à ce système est faible, la « solubilité » de la protéine dans cette matrice l'est aussi. L'ordre obtenu pour les facteurs de saturation est donc PC ~

PC/PG < PC/PE < PC/Chol. Une étude en spectroscopie de fluorescence a établi un ordre semblable (Ramakrishnan et al., 2001). Il est intéressant de noter que les valeurs de n_{LP} obtenus par le modèle de Scatchard (**Tableau V**) démontrent la même tendance que celle obtenue dans le cas du facteur de saturation des membranes. Ces résultats indiquent que la composition lipidique influence considérablement l'association des BSP-A1/A2 aux membranes. Notamment, la POPE et le cholestérol (beaucoup plus efficacement que la POPE) diminueraient la capacité de liaison de la BSP-A1/A2. Ces deux lipides diminuent le désordre des chaînes apolaires dans la phase fluide (Brown and London, E., 1998). Ainsi, ces observations suggèrent que la liaison de la protéine aux membranes est régulée par la rigidité de la membrane. Il a été démontré que la BSP-A1/A2 ne réagit pas directement avec le cholestérol (Desnoyers and Manjunath, P., 1992; Moreau and Manjunath, P., 1999; Müller et al., 2002). Ainsi, il est possible que la protéine ne puisse se lier dans les régions de la membrane qui sont enrichies de cholestérol. Un effet similaire peut se produire dans le cas des membranes contenant de la POPE, puisqu'un appauvrissement en POPE a été observé dans les régions où la protéine se lie (Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997). Ainsi seraient limitées les régions de la membrane disponibles pour lier la protéine.

L'analyse des titrages par le modèle de Seelig et celui de Scatchard a permis d'obtenir des conclusions similaires. D'abord, la protéine a davantage d'affinité pour les membranes de PC contenant 30% (mol/mol) de PE que pour celles de PC pure. Ensuite, les données indiquent que la présence de 30% (mol/mol) d'un phospholipide anionique, la PG, n'affecte pas vraiment l'interaction de la protéine avec les membranes de PC. Finalement, il a été démontré que le cholestérol nuit à l'association de la protéine dans la bicouche.

La présente étude est la première à montrer l'affinité accrue de la protéine pour les membranes de PC/PE. Premièrement, une étude en SPR démontre que la protéine a beaucoup plus d'affinité pour une monocouche de DMPC/Cholestérol (7/3) que pour une monocouche de DPPE/Cholestérol (7/3) (Thomas et al., 2003).

Deuxièmement, une étude en RPE démontre que la protéine se lie moins aux PE des membranes qu'aux PC (Müller et al., 1998). Dans cette étude, 1% de lipides marqués d'une sonde nitroxyde (PC ou PE) est introduit dans une matrice de PC. Ces deux études montrent qu'il ne semble pas exister d'interactions spécifiques favorables entre la BSP-A1/A2 et la PE. L'affinité accrue observée ici serait donc associée aux propriétés de la bicouche mixte PC/PE. Il est possible que l'hétérogénéité de l'interface soit à l'origine de ce phénomène. Les membranes modèles de POPC/POPE (7/3), utilisées lors de la présente étude, se rapprochent davantage des membranes des spermatozoïdes. Effectivement, parmi les principaux phospholipides qui les composent, plus de 66% sont des cholines (phosphatidylcholine et sphingomyéline) et 17% sont des phosphatidyléthanolamines (Selivonchick et al., 1980; Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997). Ainsi, il est possible que la présence des lipides de type PE et leur proportion dans les membranes de spermatozoïdes ne soient pas fortuits, jouant un rôle dans l'association de la protéine aux gamètes.

Bien que l'affinité de la protéine pour les membranes de PC/PG soit du même ordre que pour les membranes de PC, l'origine des interactions est différente. L'application de la théorie de Gouy-Chapman suggère que les interactions électrostatiques de longue portée (incluses dans K_{TOT}) régissent l'association de la BSP-A1/A2 à ces membranes.

L'insertion de cholestérol dans les membranes de PC a aussi permis de démontrer que la composition lipidique est importante dans l'interaction des membranes avec la BSP-A1/A2. Les deux modèles (Seelig et Scatchard) utilisés pour interpréter les expériences ITC ont permis de déterminer que l'affinité de la protéine pour les membranes de PC est grandement diminuée par la présence de 30% (mol/mol) de cholestérol. En effet, de plus petites valeurs de K_p^{int} et de K ainsi qu'un plus grand facteur de saturation vont en ce sens. Cette observation est en désaccord avec une étude en RPE (Swamy et al., 2002) qui indique que l'association de la BSP-A1/A2 aux membranes de PC est augmentée par la

présence de cholestérol dans des proportions similaires à celles utilisées dans la présente étude. Cependant, les hypothèses émises dans la détermination de la constante de partage en RPE diffèrent de celles de la présente étude. L'équilibre correspondant à la constante trouvée par Swamy et al. est celui entre un phospholipide lié à la protéine et un phospholipide non-lié. Lors de l'étude ITC, l'équilibre décrit par les constantes K_P^{int} et K est celui entre la protéine liée à la membrane et la protéine non-liée. Il est donc impossible de comparer simplement les résultats en ITC à ceux de Swamy et al. Toutefois, les observations en ITC et celles en RPE sont en accord en ce qui concerne l'effet non-négligeable de la présence de cholestérol dans les membranes de PC sur leur interaction avec la BSP-A1/A2. Une valeur plus faible de K_P^{int} pourrait être attribuable à la rigidification de la membrane par le cholestérol. La protéine éprouverait alors plus de difficulté à pénétrer dans la partie hydrophobe de la bicouche, ce qui limiterait le partage de la protéine entre la membrane et la phase aqueuse. Il est aussi possible que cet équilibre soit restreint en raison de la diminution de la flexibilité de la membrane. Effectivement, il est possible que la protéine modifie la courbure de la membrane aux endroits où elle se lie, alors que ce phénomène est défavorisé dans le cas d'une membrane plus rigide. Tel qu'évoqué antérieurement, l'augmentation du facteur de saturation pour les membranes contenant du cholestérol pourrait être due à la formation de domaines riches en ce lipide. Ces régions de la membrane ne pourraient pas accueillir la protéine en raison d'une rigidité trop importante. Or, cette explication pourrait aussi justifier une diminution de la constante de partage.

L'application de la théorie de Gouy-Chapman a permis de déterminer que la charge effective, Z_P , de la BSP-A1/A2 est positive et varie de +0,6 à +1,7 pour les différents systèmes lipidiques étudiés (**Tableau IV**). Le seul système lipidique portant une charge nette, soit les membranes de POPC/POPG (7/3), a permis de déterminer le signe positif de Z_P à l'aide de ce modèle. Riche en acide aspartique et en acide glutamique, la BSP-A1/A2 est une protéine acide portant une charge nette négative dans les conditions physiologiques (Desnoyers et al., 1994).

Cependant, les nombreux résidus Arg et Lys dans les domaines Fn2 de la protéine pourraient contribuer lui donner une charge apparente positive, dépendamment de sa conformation tridimensionnelle. Il est à noter que la théorie de Gouy-Chapman constitue un modèle rudimentaire pour décrire les interactions impliquant les peptides et les protéines. Effectivement, des divergences entre les valeurs de Z_p et les charges réelles ont été reportées, pour tous les cas étudiés ; la mélittine (Beschiaschvili and Seelig, J., 1990) et quelques peptides amphiphiles synthétiques par exemple (Percot et al., 1999). Ceci serait attribuable aux approximations sur lesquelles est basée cette théorie, notamment celle qui estime que la protéine est une charge ponctuelle. Les petites variations de Z_p d'un système lipidique à l'autre pourraient s'expliquer par les différences des propriétés physiques des membranes selon leur composition. Effectivement, l'orientation et la profondeur d'insertion de la protéine dans la membrane devraient dépendre de ces propriétés et engendrer des valeurs de Z_p un peu différentes.

2.4.2 Interactions entre la BSP-A1/A2 et les substrats solubles

L'association de la BSP-A1/A2 à la phosphocholine est un phénomène exothermique à 37 °C. Il est à noter que la composante endothermique qui était détectée pour l'interaction de la protéine avec les membranes n'apparaît plus. L'enthalpie molaire de liaison obtenue pour ce système est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour les membranes de POPC. Ainsi, la structure en bicouche ne serait pas requise pour que l'association se produise. Ceci appuie l'hypothèse de la reconnaissance spécifique de la choline par la BSP-A1/A2. De plus, la liaison de la protéine semble plus favorisée enthalpiquement pour le substrat soluble que pour la membrane analogue. Effectivement, l'enthalpie de liaison obtenue pour la phosphocholine est significativement plus négative que celle obtenue pour les membranes de POPC. Ceci pourrait se raisonner en considérant la liberté accrue des molécules qui faciliterait le recouvrement entre la phosphocholine et son site de liaison potentiel dans la protéine.

La constante d'affinité, obtenue selon le modèle de Scatchard, pour l'interaction entre la BSP-A1/A2 et la phosphocholine est très similaire à celle obtenue pour les membranes de POPC (**Tableau V**). Ainsi, il semble que les sites de liaisons impliqués soient semblables dans le cas du segment soluble et de la membrane analogue. Ce qui diffère dans les deux systèmes est le nombre de molécules par protéine liée. Effectivement, la stœchiométrie de la liaison entre la phosphocholine et la protéine serait de 4, alors que pour les membranes de POPC ce ratio de 10 (**Tableau V**). Pour la liaison de la protéine à la phosphocholine, un ratio de 2 était attendu (Wah et al., 2002). À présent, aucune raison établie ne peut justifier cette différence avec la littérature. La tendance à la baisse par rapport à la valeur de $n_{L/P}$ obtenue pour POPC est toutefois cohérente avec la littérature.

Le fait qu'aucune enthalpie de liaison significative n'ait été mesurée pour l'association entre la BSP-A1/A2 et la phosphoéthanolamine est en accord avec l'hypothèse de la spécificité de la liaison entre la protéine et les lipides. Une étude en spectroscopie de fluorescence a aussi montré que la protéine n'interagit pas directement avec la phosphoéthanolamine (Ramakrishnan et al., 2001). D'autre part, une étude SPR a obtenu une réponse trop faible lors du passage de la protéine sur des monocouches de DMPE et de DPPE contenant 30% mol/mol de cholestérol, empêchant toute analyse fiable de ces interactions via cette technique (Thomas et al., 2003). Ainsi, les résultats de l'étude ITC, en accord avec la littérature, indiquent que la BSP-A1/A2 n'est pas en mesure de reconnaître la tête polaire de type phosphoéthanolamine. Toutefois, il a été démontré que l'association de la BSP-A1/A2 est favorisée par la présence de 30% (mol/mol) de POPE dans les membranes de POPC. S'il est considéré que la protéine ne reconnaît pas les lipides ayant une tête PE, l'interaction de la protéine avec les membranes serait donc influencée par les propriétés structurales de celles-ci.

2.4.3 Conclusions

Les résultats présentés indiquent clairement que la composition lipidique joue un rôle important dans l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les membranes. Ils confirment que la protéine interagit de façon plutôt spécifique avec les phospholipides portant une tête choline. Cependant, l'association de la protéine aux membranes serait aussi modulée par les propriétés physiques de la membrane, telles que l'ordre des chaînes et la courbure. Notamment, le cholestérol et les phosphatidyléthanolamines seraient en mesure d'influencer la liaison de la protéine sans toutefois interagir directement avec elle (Desnoyers and Manjunath, P., 1992; Moreau and Manjunath, P., 1999; Müller et al., 2002; Thomas et al., 2003). Ceci est intéressant puisque ces deux lipides sont présents dans la membrane des spermatozoïdes. De surcroît, des études ont montré que ces lipides sont impliqués dans le processus de capacitation. Plus particulièrement, l'efflux du cholestérol mène à la diminution du rapport cholestérol/phospholipide dans les membranes des spermatozoïdes (Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997; Thérien et al., 1999). En ce qui a trait aux lipides de type phosphatidyléthanolamine, leur distribution dans les feuillets externe et interne des membranes des spermatozoïdes est modifiée lors des différentes étapes de la capacitation (Nolan and Hammerstedt, R.H., 1997). Ainsi, la liaison des protéines du liquide séminal aux membranes serait l'amorce d'un processus complexe.

Chapitre 3 : Étude des modifications morphologiques des membranes lipidiques induites par la BSP-A1/A2 par microscopie de fluorescence

3.1 Introduction

Cette partie de l'étude menée sur les interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides avait pour objectif d'observer les modifications morphologiques des membranes de PC induites par la BSP-A1/A2. La microscopie électronique a permis de mettre en évidence que la protéine perturbe les membranes de façon à ce que ces dernières se réarrangent pour former des structures tubulaires (voir **Chapitre 1, Figure 1.7**). Les observations de Lafleur et Edwards (communication personnelle) indique que ces structures atteignent plusieurs μm de long. La microscopie de fluorescence a été utilisée afin de tenter d'observer de telles structures et de confirmer leur nature lipidique. Cette technique offrait des informations complémentaires à celles obtenues en microscopie électronique. Aussi, la diffusion de la lumière a été utilisée afin de déterminer si la protéine a un effet sur la taille des particules en suspension. Cette portion du projet consistait en des expériences préliminaires qui ouvriront possiblement la voie pour des recherches plus approfondies.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Matériel

Les provenances du MOPS, du cholestérol, de la POPC ainsi que de la BSP-A1/A2 sont les même que décrite précédemment (voir **Chapitre 2, Section 2.2**). Le β -BODIPY ® 500/510 C₁₂-HPC (2-(4,4-difluoro-5-méthyl-4-bora-3a,4a-diaza-

s-indacène-3-dodécanoyl)-1-hexadécanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) a été obtenu de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Les solutions de protéines et suspensions lipidiques ont été préparées dans le tampon MOPS (10 mM, pH 7), lui-même préparé avec de l'eau ultra-pure (18,2 M Ω cm⁻¹). Le pH des solutions de protéine a été mesuré et réajusté au besoin.

3.2.2 Préparation des MLV

Un mélange de β -BODIPY @ 500/510 C₁₂-HPC et de POPC (avec ou sans cholestérol) a été préparé de façon à contenir 0,01% (mol/mol) de sonde fluorescente. Pour ce faire, la sonde a été dissoute dans une petite quantité de méthanol et la POPC, dans une solution de benzène/méthanol (90/10 (vol/vol)). Des quantités appropriées de chaque solution ont été mélangées et lyophilisées. Pour le mélange contenant du cholestérol (30% mol/mol), ce dernier a été dissout dans une solution de benzène/méthanol (90/10 (vol/vol)) et ajouté au mélange à lyophiliser. La poudre résultante a été hydratée avec la solution tampon MOPS (10 mM, pH 7) de façon à obtenir une concentration de PC d'environ 1 mM. La suspension obtenue a été soumise à 5 cycles gel-dégel (de l'azote liquide à ~35 °C) afin d'assurer une bonne hydratation des lipides. La concentration exacte de la suspension de MLV a été déterminée par la méthode de Fiske et Subbarow (Fiske and Subbarow, Y., 1925).

3.2.3 Microscopie de fluorescence

Les images présentées ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal à balayage muni d'un laser, soit le Molecular Dynamics Multiprobe 2001TM Inverted CLSM system (Multiprobe, Santa Barbara, CA, USA). Une source laser de 488 nm a été utilisée pour exciter la sonde fluorescente. Un filtre dont la bande passante était centrée à 510 nm précédait le détecteur afin de ne récupérer que la

lumière émise par la sonde. Certaines images en épifluorescence ont été obtenues sur un microscope Olympus IX81 (Olympus, Melville, NY, USA).

Un aliquot (100 μL) de la suspension lipidique (1,17 mM) a été déposé au centre d'une fine lamelle de verre ronde retenue dans un support. Une seconde lamelle a été déposée sur ce support afin de limiter l'évaporation de l'eau. Après avoir enregistré quelques images des MLV, 24,4 μL de la solution de BSP-A1/A2 (0,2 mM) a été ajouté directement à la suspension lipidique, de façon à obtenir un ratio molaire PC/BSP de 24. Cette addition a été effectuée à partir de deux aliquots de 12,2 μL ajoutés à environ 1 h d'intervalle. Des images ont été obtenues après chacune des additions. Cependant, les images présentées ont toutes été enregistrées après la seconde addition (ratio PC/BSP de 24).

3.2.4 Diffusion de la lumière

Un échantillon a été préparé de façon analogue à celui utilisé en microscopie de fluorescence (ratio PC/BSP = 24). La taille des particules en suspension a été mesurée (à 25 °C) à l'aide d'un appareil de diffusion quasi-élastique de la lumière Coulter N4 Plus (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), couplé à un autocorrelateur (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Entre les mesures de diffusion de la lumière, l'échantillon a été conservé à la température ambiante (~25 °C). En tout temps, la cuvette était recouverte afin d'éviter l'évaporation de l'eau.

3.3 Résultats

3.3.1 MLV de POPC et de POPC/Chol

Dans un premier temps, les MLV de POPC ont été observées en absence de protéine. La **Figure 3.1A** représente l'allure typique de MLV de POPC. Les

bicouches étaient visibles et la taille des vésicules détectables était plutôt hétérogène, variant de moins de 1 μm à plus de 10 μm . Cette polydispersité est attendue pour une suspension multilamellaire (El Jastimi et al., 1999). D'ailleurs, les structures multilamellaires sont parfois bien visibles (**Figure 3.1B**). Des images similaires ont été obtenues pour les MLV de POPC/Chol.

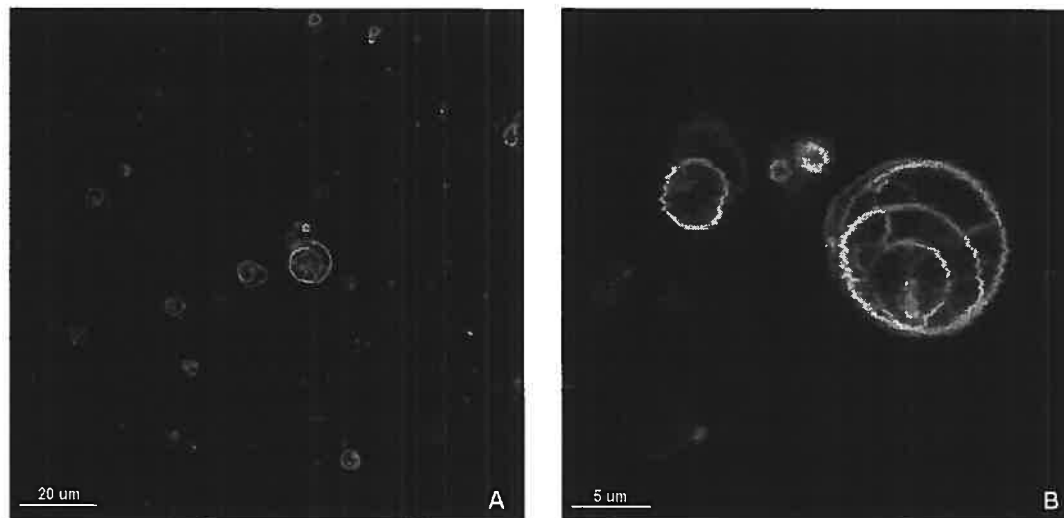


Figure 3.1 : Micrographe de MLV de POPC (contenant 0,01% mol/mol de β -BODIPY $\text{\textcircled{R}}$ 500/510 C_{12} -HPC). (A) Image représentative de la suspension démontrant une certaine polydispersité de la taille des MLV. (B) Vésicule multilamellaire de grande taille. Micrographes enregistrés en mode confocal avec un objectif 100x à l'huile.

3.3.2 Effet de la BSP-A1/A2 sur la forme des membranes de POPC

À un ratio lipides/protéine de 24, plusieurs structures intéressantes ont été observées. Les différentes structures présentées (**Figure 3.2**) ont été observées à plusieurs reprises et à divers endroits dans l'échantillon. Des structures en collier étaient généralement formées de vésicules ayant un diamètre de l'ordre de

quelques (1-3) μm (**Figure 3.2C**). Ces colliers pouvaient contenir jusqu'à une dizaine de « perles ». Sont aussi observés, des tubes courts et épais ne dépassant généralement pas les 20 μm de longueur et ayant un diamètre typique de l'ordre de 1 μm (**Figure 3.2B**). Des tubes beaucoup plus longs, pouvant atteindre 100 μm , ont aussi été observés (**Figure 3.2D**). Leur diamètre, parfois difficile à évaluer, avoisinait 0,25 μm . Finalement, les protubérances, telles que celle présentée à la **Figure 3.2A**, ont été observées occasionnellement. Une augmentation du nombre des petites particules a aussi été notée après quelques heures (~3 h) d'incubation. La transformation d'un collier en long tube fin a été observée une seule fois lors de cette étude (**Figure 3.3**). Les images présentées ont été prises à environ 10 secondes d'intervalle. On remarque que ces structures tubulaires sont flexibles.

Initialement, la BSP-A1/A2 a été ajoutée à la suspension de MLV de POPC afin d'obtenir un ratio PC/BSP de 48. Ces conditions correspondent à celles utilisées par Lafleur et Edwards en microscopie électronique (communication personnelle). Quoique quelques structures intéressantes aient été observées, la récurrence de ces phénomènes était plutôt limitée, même après 1 h d'incubation. Il n'avait possiblement pas suffisamment de protéine ou le temps d'incubation n'était pas suffisant. Ainsi, une seconde quantité de protéine a été ajoutée à la dispersion, menant le ratio PC/BSP à 24, afin de stimuler la formation des structures recherchées.

Lorsque les membranes de POPC contiennent 30% (mol/mol) de cholestérol, quelques structures intéressantes, similaires à celles observées pour les vésicules de POPC pure, ont été observées pour un ratio PC/BSP de 24. Toutefois, ces événements étaient plutôt rares, contrairement au cas de POPC sans cholestérol.

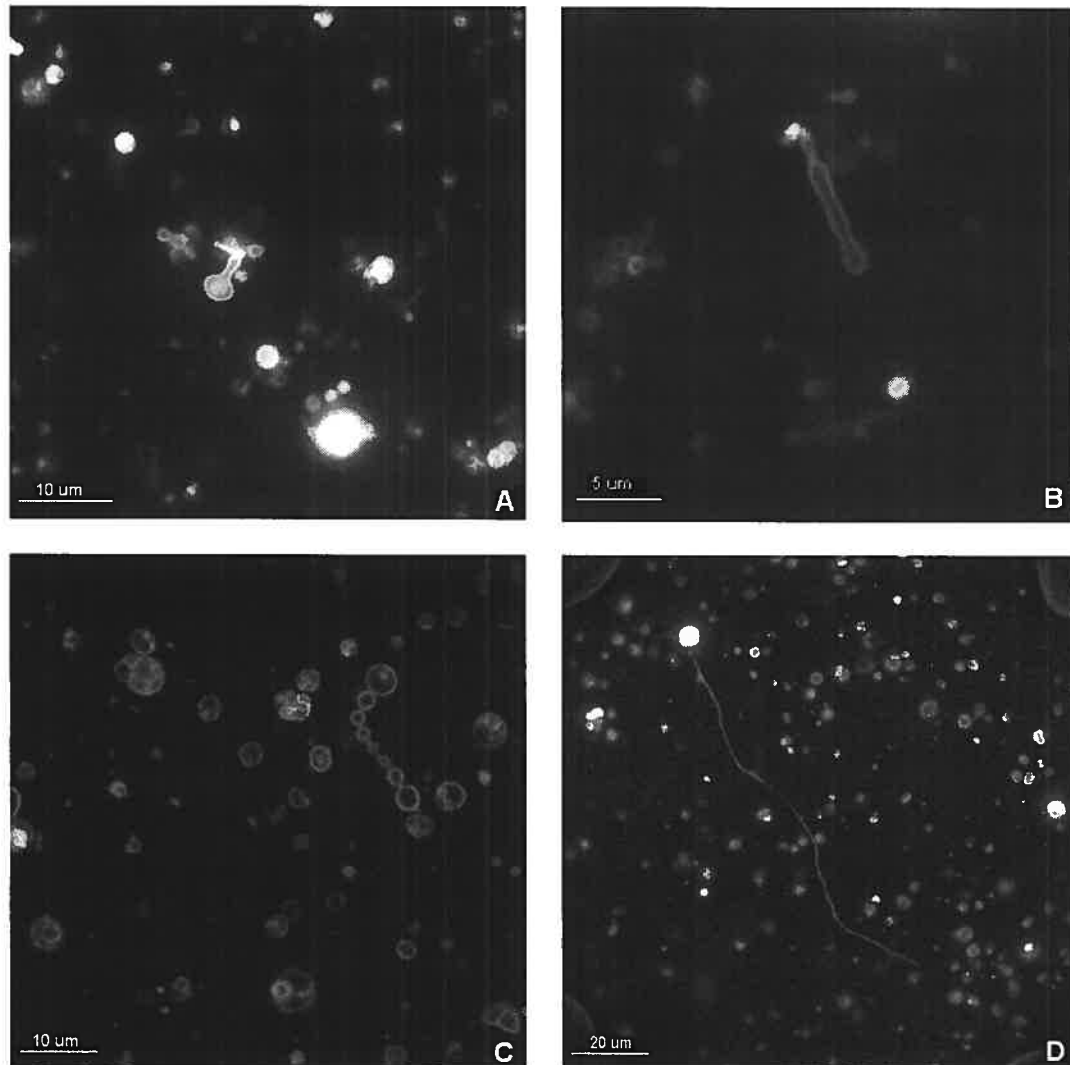


Figure 3.2 : Modifications morphologiques des MLV de POPC induites par la BSP-A1/A2 (ratio PC/BSP = 24). (A) Protubérance sur une vésicule. (B) Tube court et épais. (C) Structure en collier. (D) Long tube fin. Micrographes A et B enregistrés en épifluorescence avec un objectif 60x à l'huile, micrographes C et D enregistrés en mode confocal avec un objectif 100x à l'huile.

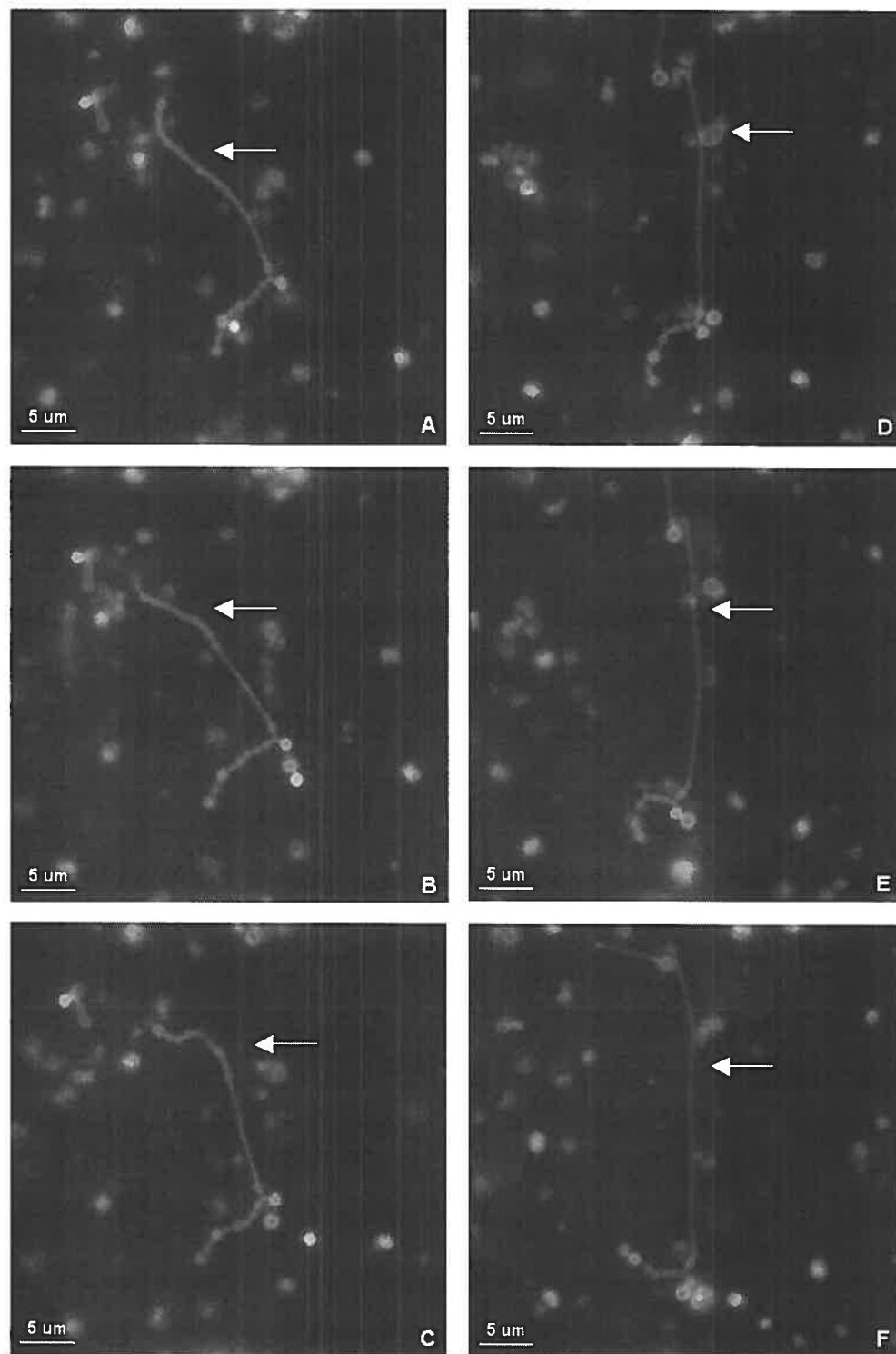


Figure 3.3 : Transformation d'un collier en long tube fin (A-F) (ratio PC/BSP = 24). La flèche indique le segment qui subit cette transformation. Micrographes enregistrés en épifluorescence avec un objectif 60x à l'huile.

3.3.3 Diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière a été utilisée afin d'obtenir une description globale de l'échantillon observé en microscopie de fluorescence. La suspension de MLV de POPC en absence de protéine s'est avéré un mélange très polydisperse. L'analyse de la diffusion mène à une distribution dont la taille moyenne des particules était environ 2 μm . Après une incubation de 2 h en présence de protéine (ratio PC/BSP = 24), la suspension est caractérisée par deux populations distinctes de particules (**Figure 3.4**). Le diamètre moyen des petites particules était d'environ 100 nm et celui des grandes, de l'ordre du micron. La proportion des petites particules est d'environ 20% et ne changeait pas significativement après 2 h d'incubation.

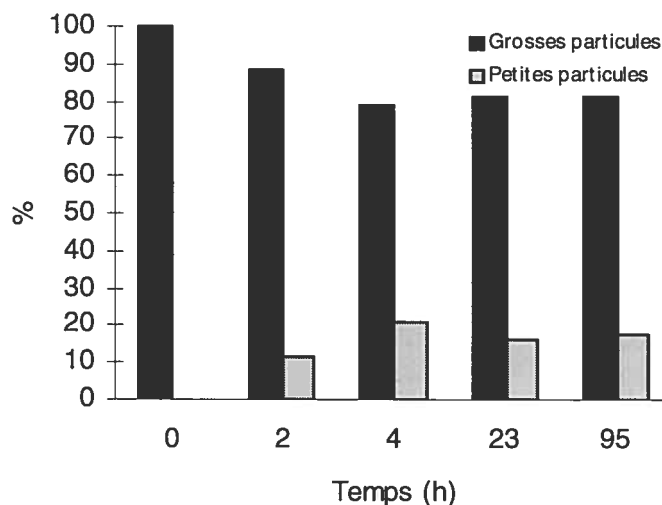


Figure 3.4 : Progression des quantités relatives de grosses et de petites particules dans la suspension de MLV de POPC en présence de la BSP-A1/A2 (ratio PC/BSP = 24; 25 °C).

3.4 Discussion

L'ajout de la BSP-A1/A2 a donné lieu à des modifications morphologiques de ces vésicules et, ce, de façon similaire à ce qui a été observé par Lafleur et Edwards (communication personnelle). Effectivement, les structures en collier et les structures tubulaires vues en microscopie électronique (voir **Chapitre 1, Figure 1.7**) ont été observées en microscopie de fluorescence. Il est important de souligner que les images obtenues en microscopie de fluorescence sont à bien plus grande échelle que celles en microscopie électronique. L'avantage majeur de la microscopie de fluorescence est qu'elle permet d'observer les déformations *in situ* et en temps réel, ce qui est impossible en cryo-TEM. De plus, puisque la sonde s'insère dans la bicouche de POPC, ces résultats confirment que les structures observées sont de nature lipidique.

Les mesures en diffusion de la lumière démontrent que la protéine induit la formation de petites particules lorsqu'elle interagit avec des vésicules de POPC. Ceci est cohérent avec l'observation de l'augmentation de plus petites particules en microscopie de fluorescence. Les particules formées avaient un diamètre moyen d'environ 100 nm. Cette taille concorde assez bien avec une étude antérieure qui a mis en évidence que la protéine engendre la formation de particules ayant un diamètre d'environ 10 à 40 nm lorsqu'elle interagit avec des LUV ($d = 100$ nm) de PC (Gasset et al., 2000). Ces objets ont été observés par microscopie électronique. La différence de taille entre cette étude et la nôtre provient peut-être de la structure initiale des membranes puisque des vésicules extrudées à 100 nm ont été utilisées au lieu de MLV. Des complexes lipide/protéine ayant environ 90 nm de diamètre ont été isolés grâce à la chromatographie d'exclusion de taille lorsque la protéine interagit sur des spermatozoïdes (Moreau and Manjunath, P., 1999). Il est possible qu'il existe une relation entre la population de petites structures observée ici et ces particules. Il est important de mentionner qu'il est difficile d'évaluer la façon dont les structures tubulaires contribuent à la diffusion dynamique de la lumière.

Les structures s'apparentant à celle présentée à la **Figure 3.2A** donnent l'impression que les tubes se forment à partir d'une vésicule. Cependant, la formation des tubules n'a pas été clairement observée. Néanmoins, la correspondance entre le diamètre des tubes courts (**Figure 3.2B**) et de certaines protubérances (**Figure 3.2A**) appuie cette hypothèse. La transformation quasi instantanée des tubes courts en structures collier a été observée une fois. Malheureusement, ces images n'ont pas été enregistrées. De plus, il était fréquent d'apercevoir plusieurs petites vésicules alignées sans être directement reliées comme dans les structures en collier. Il est possible qu'elles étaient reliées entre elles par une membrane externe telle que vue en cryo-TEM. Il est également concevable que les « perles » des colliers se dissocient pour former de plus petites vésicules. La **Figure 3.3** permet de croire que les colliers peuvent aussi se réarranger pour former les longs tubes fins. La **Figure 3.5** résume l'ordre proposé pour les transitions morphologiques.

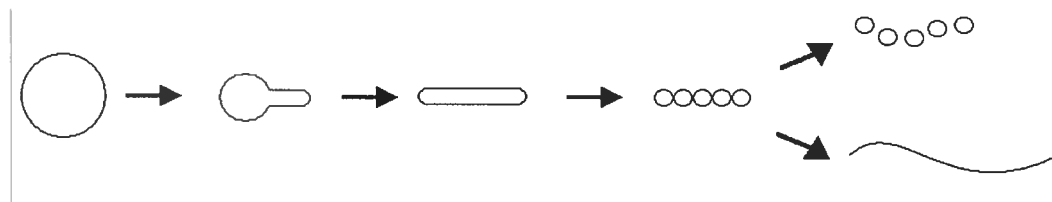


Figure 3.5 : Ordre des transitions morphologiques induites par la BSP-A1/A2 proposé suite aux observations en microscopie de fluorescence.

L'ordre des transformations proposé ici est cohérent avec celui proposé par Hotani et al. pour des liposomes unilamellaires géants (giant unilamellar vesicles, GUV), soit des vésicules ayant un diamètre de l'ordre des dizaines de microns, en présence de pression osmotique (Hotani et al., 1999). Cette pression osmotique de part et d'autre de la membrane induit un débalancement de l'aire des feuillettes qui mène à des modifications morphologiques qui peuvent être rationalisées (Hotani et al., 1999).

Clairement, la BSP-A1/A2 induit la réorganisation de la morphologie des membranes de vésicules composées de phosphatidylcholine. Les images obtenues en microscopie de fluorescence sont cohérentes avec les observations de Lafleur et Edwards. Des structures similaires à celles rencontrées pour le présent système ont été reportées pour d'autres systèmes (Staneva et al., 2004; Staneva et al., 2005; Tanaka et al., 2002; Lee, 2005). Notamment, les ions lanthanides induisent la formation de structures en collier lorsqu'ils interagissent avec des vésicules de PC (Staneva et al., 2004). De plus, la phospholipase A2 (Staneva et al., 2005) et le détergent Triton X-100 (Tanaka et al., 2002) donnent lieu à la formation de protubérances sur des vésicules de PC/SM/Cholestérol (45:45:10). Il est à noter que ces études ont été effectuées sur des GUV. Des structures similaires ont aussi été observées pour des LUV en présence un gradient de pH entre l'intérieur ($\text{pH}_{\text{int}} = 4.0$) et l'extérieur ($\text{pH}_{\text{ext}} = 7.5$) de vésicules de PC contenant 10% (mol/mol) de PG (Mui et al., 1995). À cause de ce gradient, le flip-flop des PG se produisait de façon à ce qu'il y ait un accroissement des PG dans le feuillet externe de la bicouche. La différence de l'aire des deux feuillets serait la force motrice de la formation de diverses structures lipidiques. En utilisant ces conditions, des structures tubulaires très semblables à celles observées lors de la présente étude sont obtenues. L'augmentation de l'aire du feuillet externe par rapport à celle du feuillet externe est le mécanisme proposé pour expliquer les déformations reportées pour d'autres systèmes tels que la phospholipase-A2 (Staneva et al., 2005) et le détergent Triton X-100 (Tanaka et al., 2002). Les modifications morphologiques pour ces systèmes sont discutées plus en détail dans le **Chapitre 1, Section 1.3**.

Des modifications morphologiques des membranes sont prévues lors du débalancement de l'aire des feuillets internes et externes de la bicouche. Ce débalancement conduit à la courbure du plan de la bicouche et à la formation de plusieurs géométries. Des calculs ont généré les structures possibles pour lesquelles l'aire totale est constante, mais le changement de courbure local accommode des aires de feuillets différents. Ces modifications de structure d'une

vésicule se traduit aussi par une diminution du volume contenu par celle-ci (Mui et al., 1995). Un diagramme des différentes structures stables est présenté à la **Figure 3.6**.

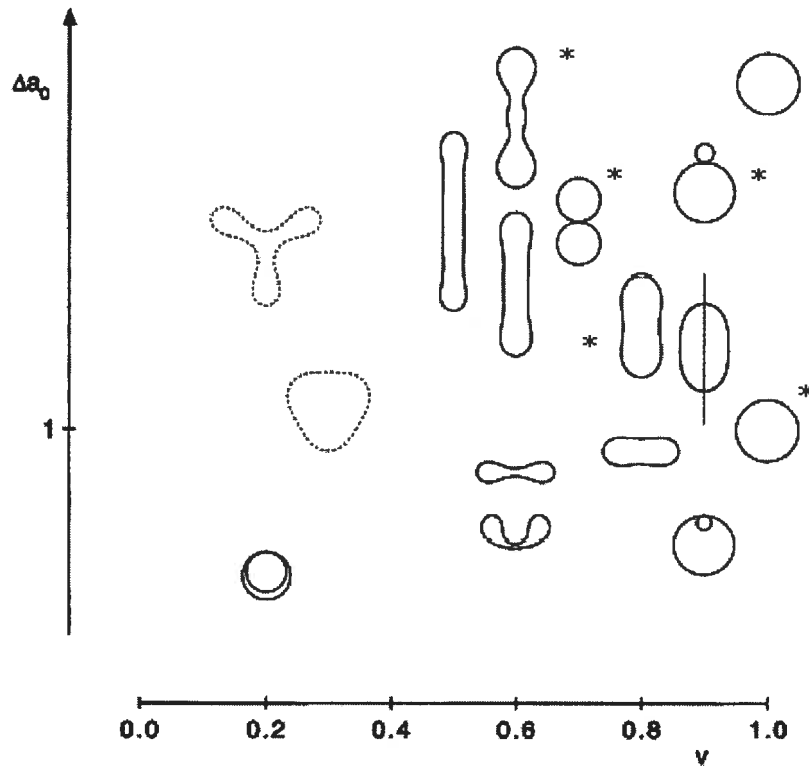


Figure 3.6 : Diagramme des morphologies prédites des vésicules (Mui et al., 1995). Le paramètre Δa_0 est un indicateur de la différence entre l'aire des feuillettes (si $\Delta a_0 > 1$, alors A_{ext} augmente, et vice versa). Le paramètre v est un indicateur du volume contenu par la vésicule (si $v < 1$, alors le volume diminue par rapport au volume de la vésicule sphérique). Il est à noter que l'aire de la membrane est constante d'une structure à l'autre et que c'est le volume qui fluctue. Ainsi, les différentes morphologies présentées ne sont pas à l'échelle. Les structures observées lors de la présente étude sont marquées d'une étoile (*).

Ce diagramme indique qu'une diminution de l'aire du feuillet externe par rapport au feuillet interne ($\Delta a_0 < 1$) mène à l'invagination des vésicules. De telles

modifications morphologiques n'ont pas été observées lors de la présente étude. Lorsque l'aire du feuillet externe augmente ($\Delta a_o > 1$), des structures allongées et parfois en collier peuvent être obtenues. Ces structures sont similaires à celles observées en microscopie de fluorescence. Les changements morphologiques résultant de l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les vésicules de POPC sont donc compatibles avec un accroissement du feuillet externe, probablement associé à l'association de la protéine à ce feuillet. Le fait que la protéine modifie la forme des vésicules de POPC/Chol dans une moindre mesure que celles de POPC est cohérent avec l'hypothèse que le cholestérol nuit à l'association de la protéine au feuillet externe. Cet effet du cholestérol sera étudié de façon plus approfondie lors de l'étude de l'interaction de la protéine avec les monocouches à l'interface air-eau dans le prochain chapitre.

En conclusion, la microscopie de fluorescence est une technique très prometteuse dans l'étude de ces transitions. Avec des conditions optimales, cette technique offre la possibilité d'observer les transitions morphologiques *in situ* et, surtout, en temps réel. De plus, l'utilisation de sondes multiples pourrait permettre de caractériser la colocalisation des composantes pour des systèmes lipidiques plus complexes. Évidemment, il serait intéressant de vérifier l'effet de la protéine sur la morphologie des membranes des spermatozoïdes.

Chapitre 4 : Étude des interactions entre la BSP-A1/A2 et les monocouches lipidiques

4.1 Introduction

Cette portion de l'étude menée sur les interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides visait à déterminer le mécanisme associé aux changements morphologiques des membranes induits par la protéine. Selon l'analyse des images obtenues en microscopie de fluorescence (voir **Chapitre 3**), une augmentation de l'aire du feuillet externe est responsable de la déformation des membranes. Il est proposé que l'association de la protéine à ce feuillet en soit responsable. Une monocouche de phosphocholine maintenue à une pression de surface de 30-35 mN/m est reconnue pour représenter assez fidèlement le feuillet externe d'une bicouche de ce lipide (Marsh, D., 1996). Ainsi, la technique des monocouches de Langmuir a été utilisée afin de déterminer si l'aire augmente lorsque la BSP-A1/A2 interagit avec une couche de POPC. De plus, l'effet de la présence de 30% (mol/mol) de cholestérol dans la monocouche a été évalué.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Matériel

Les provenances du MOPS, du cholestérol, de la POPC ainsi que de la BSP-A1/A2 sont les mêmes que décrites précédemment (voir **Chapitre 2, Section 2.2**). L'EDTA (acide éthylènediamine-tétraacétique) a été acheté de Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Le NaCl provenait de Anachemia (Rouses Point, NY, USA).

4.2.2 Préparation des solutions

Toutes les solutions de protéines ont été préparées dans le tampon MOPS (10 mM de MOPS, 100 mM de NaCl, 0,5 mM d'EDTA, pH 7), lui-même préparé avec de l'eau ultra-pure (18,2 M Ω cm⁻¹). Une solution mère d'environ 2,5 mg/ml de BSP-A1/A2 a été préparée et dosée en mesurant l'absorbance à 280 nm et utilisant $\epsilon_{280\text{nm}} = 36\ 000\ \text{cm}^{-1}$ (Gasset et al., 1997). Afin d'obtenir une solution ayant une concentration de protéine de l'ordre du mg par litre, une quantité appropriée de la solution mère a été diluée avec du tampon. Le pouvoir tampon utilisé était suffisant pour maintenir le pH de la solution de protéine à 7.

La POPC a été dissoute dans un mélange de chloroforme/méthanol (2/1, vol/vol) de manière à obtenir une concentration d'environ 1 mg/ml. Une solution de POPC/Chol dans un rapport molaire de 7/3 a aussi été préparée de façon à contenir 1 mg/ml de POPC. Lors de chaque utilisation, un aliquot de la solution de lipides a été prélevé afin d'effectuer un dosage des phospholipides par la méthode de Fiske-Subbarow (Fiske and Subbarow, Y., 1925).

4.2.3 Le bain de Langmuir

La cuve Langmuir-Blodgett (NIMA Technology, Coventry, Angleterre) utilisée pouvait contenir un volume d'environ 450 ml (300 x 200 x 5 mm). Le système était placé sur une table anti-vibrations car la mesure de la pression de surface est très sensible aux vibrations environnantes. Le système de circulation d'eau (FisherScientific, Pittsburgh, PA, USA) a permis de maintenir la température de la cuve à 25,0 \pm 0,1 °C pour toutes les expériences. Π a été mesurée à l'aide d'un papier filtre (Whatman, largeur 10 mm, épaisseur 0,15 mm) partiellement immergé dans la sous-phase. Avant chaque utilisation, la cuve a été remplie d'eau ultra-pure et la surface a été balayée par la barrière jusqu'à compression complète. Si la pression de surface était non-négligeable ($> 0,1$

mN/m), les résidus se trouvant sur l'interface restreinte ont été aspirés par succion. Le cas échéant, ceci a été répété jusqu'à ce que la pression de surface soit négligeable. Ensuite, le bain fût vidé et prêt à utiliser.

4.2.4 Isothermes de compression de POPC

Des isothermes de compression (Π -A) d'une monocouche de POPC ont été obtenus en absence de protéine. D'abord, la cuve a été remplie de tampon MOPS de façon à ce que la surface dépasse légèrement (d'environ 1 mm) les rebords de la cuve. Cette précaution assure un bon contact entre la barrière et l'interface. Ensuite, la surface a été balayée à nouveau afin de vérifier que la sous-phase était dépourvue de molécules tensioactives. Si la pression de surface excédait 0,1 mN/m à compression complète, les contaminants ont été aspirés. Lorsque la surface était propre, la barrière a été déplacée à sa position ouverte. Typiquement, 30-35 μL de la solution de POPC ont été déposés à l'interface, goutte-à-goutte, à l'aide d'une microsiringue de 50 μL . Un temps d'attente de 5 minutes a été alloué à l'évaporation du solvant avant de débiter la compression à une vitesse constante (200 cm^2/min). L'acquisition de Π en fonction de l'aire moléculaire (A) a été démarrée dès le début de la compression.

4.2.5 Adsorption de la BSP-A1/A2 à l'interface air-eau

Les courbes de Π en fonction du temps pour une surface fixe ont été obtenues pour deux concentrations différentes de protéine dans la sous-phase, soit 0,90 et 1,14 mg/L. Pour ces expériences, la cuve a été remplie d'une solution de protéine en s'assurant que la position de la barrière était ouverte au maximum. Aussitôt le remplissage de la cuve terminé, le zéro de la pression de surface a été effectué et l'acquisition de la pression de surface en fonction du temps a été démarrée.

4.2.6 Interaction entre la BSP-A1/A2 et une monocouche

Les courbes de A en fonction du temps pour une pression fixe ont été obtenues pour une monocouche de POPC et pour une monocouche de POPC/Chol (7/3). Ces expériences ont été effectuées dans les mêmes conditions. La cuve a été remplie d'une solution de BSP-A1/A2 à la concentration choisie suite aux expériences d'adsorption de la protéine à l'interface air-eau, soit 0,90 mg/L. Une monocouche de lipide a été obtenue selon la méthode décrite précédemment. À un taux de compression atteignant un maximum de 200 cm^2/min , la monocouche lipidique a été compressée jusqu'à une pression de surface d'environ 35 mN/m (variation inférieure à 1% pendant l'expérience). Lorsque cette pression a été atteinte, l'acquisition de A en fonction du temps a été démarrée. Cette façon de faire a été adoptée afin que la concentration initiale de protéine dans la sous-phase soit faible et homogène.

4.3 Résultats

4.3.1 Isotherme de compression de monocouches lipidiques

L'isotherme de compression d'une monocouche de POPC a été obtenu afin de valider la délicate technique d'épandage des lipides ainsi que pour déterminer la pression de surface qui sera utilisée afin de mimer l'entassement des phospholipides dans une bicouche de la même nature.

La **Figure 4.1** représente l'isotherme Π - A typique obtenu pour une monocouche de POPC à 25 °C. Un triplicata de cet isotherme a été obtenu et a démontré une très bonne reproductibilité (variabilité inférieure à 10%). De plus, il correspond bien avec les données reportées dans la littérature. En effet, les molécules de POPC interagissent de façon à ce qu'une pression de surface soit

mesurable lorsque A atteint $(116 \pm 3) \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, comparativement à une valeur de la littérature de $\sim 100\text{-}120 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (Matti et al., 2001; Yun et al., 2003). De plus, la valeur de Π_c obtenue est de $(47 \pm 1) \text{ mN/m}$, alors que la littérature rapporte $\sim 45\text{-}50 \text{ mN/m}$ (Matti et al., 2001; Yun et al., 2003). Aussi, l'isotherme de POPC démontre que A_{lim} correspond à $(90 \pm 8) \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, comparativement à $\sim 80\text{-}100 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Finalement, il y a absence de plateau correspondant à la transition LE-LC tel qu'attendu (Matti et al., 2001; Yun et al., 2003). La monocouche de POPC serait maintenue dans la phase LE jusqu'au point de rupture puisqu'elle est compressée à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, une température bien au-delà de sa température de transition étant de $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Marsh, D., 1990; Sanchez and Badia, A., 2003).

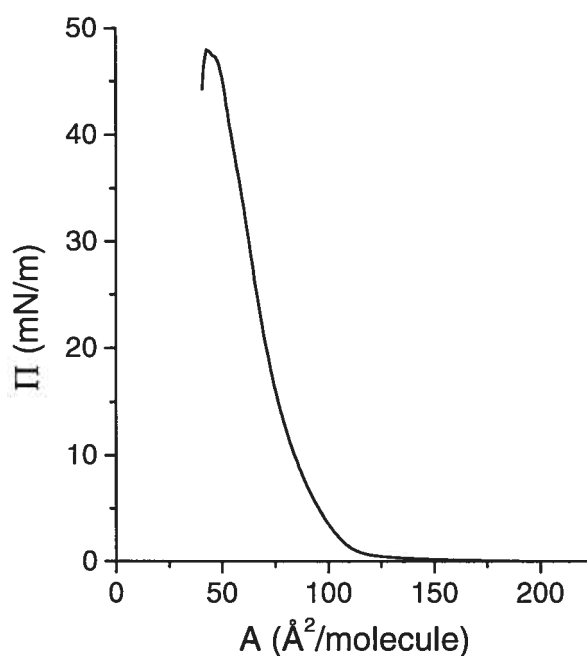


Figure 4.1 : Isotherme de compression d'une monocouche de POPC. La sous-phase était la solution tampon MOPS (10 mM), EDTA (0.5 mM), NaCl (100 mM) pH 7 et le taux de compression constant était de $200 \text{ cm}^2/\text{min}$.

Afin d'étudier un système protéine/lipide qui ressemble à celui des spermatozoïdes, il faut que la densité moléculaire de la monocouche soit similaire à celle d'une membrane naturelle. Or, il est admis qu'une monocouche maintenue à une pression de surface de 30-35 mN/m a des propriétés qui concordent bien avec celles d'une bicouche (Marsh, D., 1996). Selon les isothermes obtenus, l'aire occupée par une molécule de POPC correspond à environ 62 \AA^2 pour une pression de surface de 35 mN/m. Cette valeur concorde assez bien avec l'aire moléculaire reportée pour POPC dans une bicouche, soit 68 \AA^2 (Beschiaschvili and Seelig, J., 1990).

4.3.2 Cinétique de l'adsorption de la BSP-A1/A2 à l'interface air-eau

La BSP-A1/A2 possède un caractère amphiphile (Seidah et al., 1987). Ainsi, il est possible qu'elle s'adsorbe à l'interface air-eau afin de minimiser le contact défavorable de ses régions hydrophobes avec l'eau. Puisque des monocouches composées exclusivement de lipides étaient désirées, il était important d'utiliser une concentration de protéine qui offrait un temps de latence suffisamment long pour permettre la préparation de la monocouche lipidique à l'interface air-eau. La formation de la monocouche nécessite environ 20 minutes, ainsi le temps de latence minimal pour l'adsorption de la protéine à l'interface devrait être d'environ 30 minutes.

La cinétique d'adsorption de la protéine est présentée à la **Figure 4.2**. Une augmentation de la pression de surface indique que la protéine s'adsorbe à l'interface air-eau. Cette observation confirme le comportement tensioactif prévu de la protéine. La cinétique d'adsorption de la protéine à l'interface est dépendante de la concentration de celle-ci.

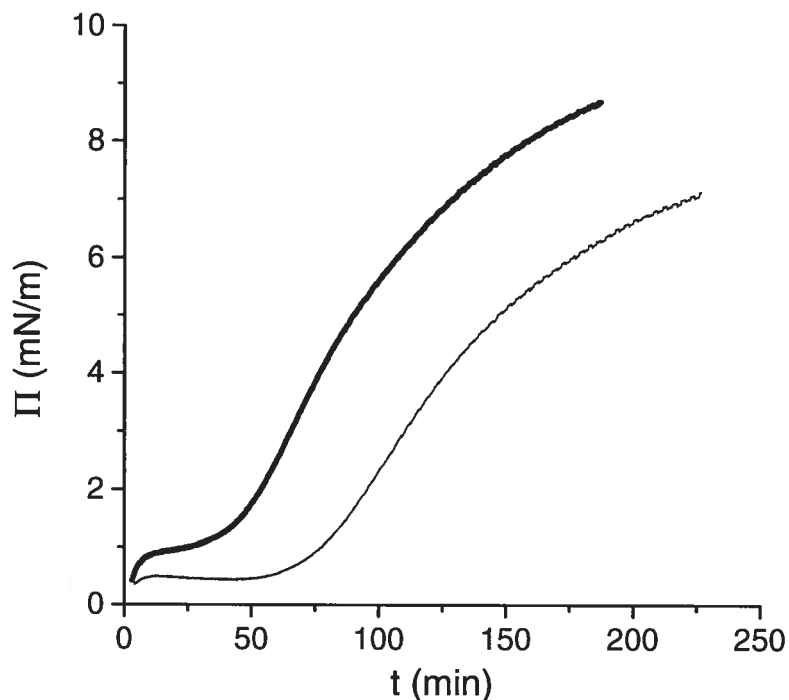


Figure 4.2 : Adsorption de la BSP-A1/A2 à l'interface air-eau. Les courbes en trait gras et en trait fin correspondent à une concentration de protéine de 1,14 mg/L et de 0,90 mg/L, respectivement.

En effet, une augmentation de la concentration de BSP-A1/A2 dans la sous-phase entraîne une adsorption plus rapide de celle-ci à l'interface. Une sous-phase contenant la protéine dans une concentration de 1,14 mg/L n'offre pratiquement pas de temps de latence. Dès les premières minutes, la pression de surface grimpe à 1 mN/m, indiquant la présence non-négligeable de protéines à l'interface. Une sous-phase contenant 0,90 mg/L de protéine allouait un temps de latence suffisant à la préparation de la monocouche lipidique. En effet, la protéine mettait près d'une heure avant de s'adsorber significativement à l'interface air-eau. Pour cette concentration de protéine, la cinétique d'adsorption a été évaluée trois fois afin de confirmer que le temps de latence est reproductible. En moyenne, il fallait (50 ± 8) min pour que la pression de surface monte de façon significative ($>$

0,5 mN/m). Puisqu'une sous-phase contenant 0,90 mg/L de BSP-A1/A2 offrait un temps de latence convenable et par soucis d'économie de protéine, la cinétique d'adsorption n'a pas été obtenue pour d'autres concentrations.

4.3.3 Interaction de la BSP-A1/A2 avec les monocouches lipidiques

La variation de l'aire de l'interface dans le temps, pour une pression de surface fixée à ~35 mN/m, a été mesurée afin de déterminer si des phénomènes tels que l'association de la protéine à la monocouche de POPC et l'extraction de lipide par celle-ci sont observés. La **Figure 4.3** représente l'allure typique des courbes de A vs t obtenues pour une monocouche de POPC. Pour ce type de courbe, le moment où la cuve a été remplie de la solution de BSP-A1/A2 est considéré comme $t = 0$. La préparation de la monocouche et la compression à la pression désirée font en sorte que l'acquisition commence à $t = 30$ min. On observe une décroissance soutenue de l'aire de l'interface, afin de maintenir Π constante.

La variation de l'aire de l'interface dans le temps a été mesurée pour une monocouche de POPC/Chol (7/3) afin de déterminer l'effet de la présence du cholestérol sur l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les lipides. La **Figure 4.4** représente l'allure typique des courbes de A vs t obtenues pour ce type de monocouche. Contrairement à ce qui a été observé avec la monocouche de POPC, une augmentation de l'aire interfaciale est obtenue pour la monocouche contenant 30% de cholestérol.

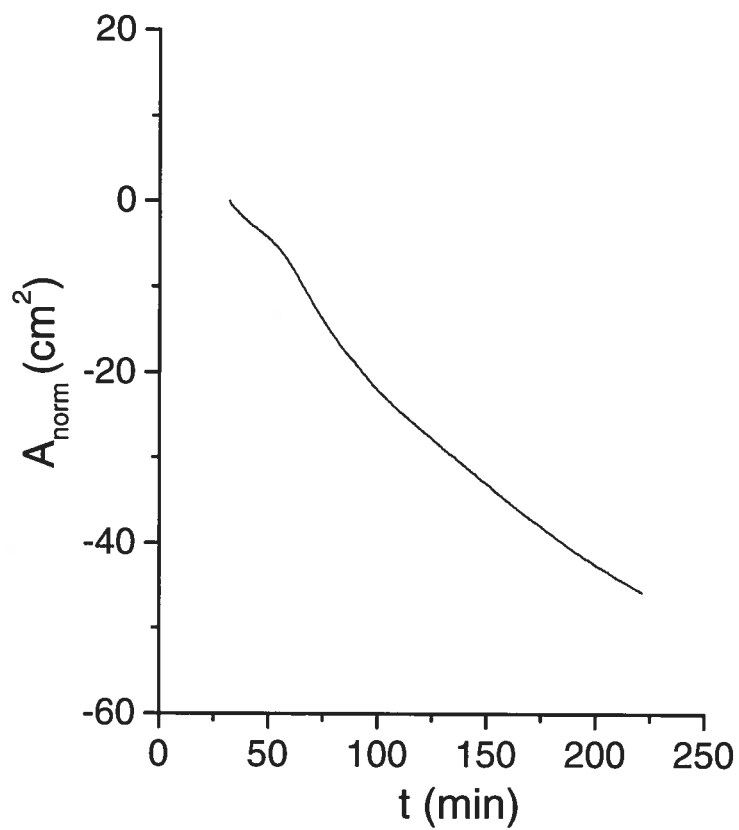


Figure 4.3 : Variation de l'aire occupée par une monocouche de POPC en contact avec une sous-phase contenant la BSP-A1/A2. La concentration de protéine dans la sous-phase était de 0,90 mg/L. La pression de surface de la monocouche était fixée à $(34,81 \pm 0,02)$ mN/m. A_{norm} correspond à la variation d'aire interfaciale par rapport à celle du début de l'acquisition.

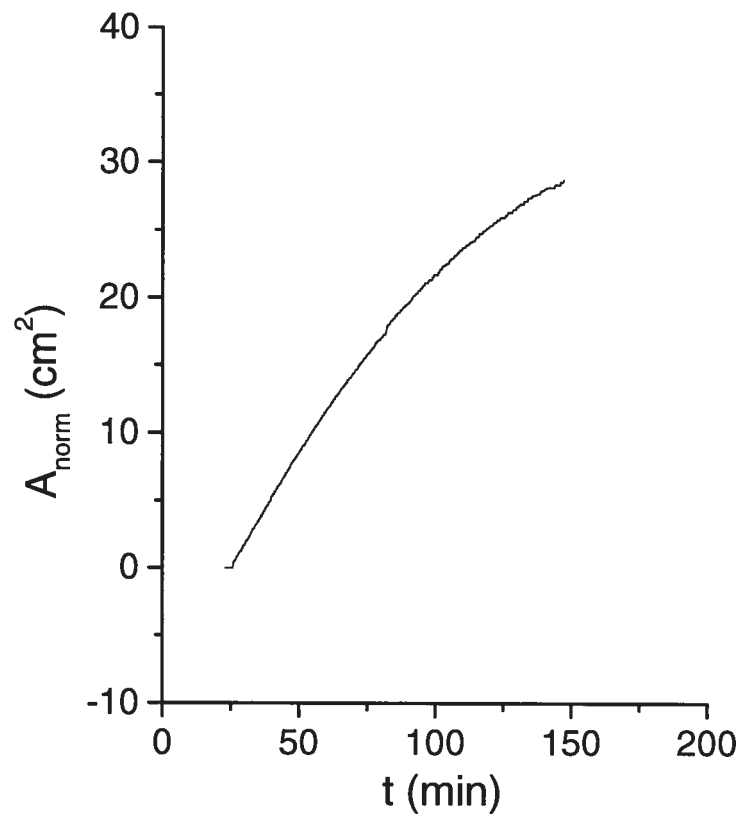


Figure 4.4 : Variation de l'aire occupée par une monocouche de POPC/Chol (7/3) en contact avec une sous-phase contenant la BSP-A1/A2. La concentration de protéine dans la sous-phase était de 0,90 mg/L. La pression de surface de la monocouche était fixée à $(34,81 \pm 0,02)$ mN/m. A_{norm} correspond à la variation d'aire interfaciale par rapport à celle au début de l'acquisition.

4.4 Discussion

Le but de cette étude était d'obtenir plus d'information sur la nature de l'interaction protéine-lipide et de rationaliser la formation de petites vésicules et de longs tubes observée en cryo-TEM (Lafleur et Edwards, communication personnelle) ainsi qu'en microscopie de fluorescence (voir **Chapitre 3**). Des changements morphologiques similaires ont été observés pour d'autres systèmes et sont attribuables à une augmentation de l'aire moléculaire du feuillet externe de la bicouche par rapport à celle du feuillet interne (Staneva et al., 2004; Staneva et al., 2005; Tanaka et al., 2002; Lee, 2005). Ainsi, il était attendu que la BSP-A1/A2 induit une augmentation de l'aire des monocouches. Or, les résultats obtenus indiquent que l'aire diminue pour une monocouche de POPC et qu'elle augmente pour une monocouche de POPC/Chol (7/3 mol/mol).

La décroissance de l'aire de la monocouche de POPC (**Figure 4.3**) en présence de la BSP-A1/A2 suggère que cette dernière induit l'extraction des lipides de l'interface vers la sous-phase ou alors qu'elle donne lieu à un phénomène de condensation latérale des lipides. Ce dernier effet est parfois observé lorsqu'une espèce chargée interagit avec une membrane chargée. Par exemple, certains polyanions tels que la polylysine et certains oligonucléotides modifient les répulsions électrostatiques entre les têtes polaires chargées de PG dans une monocouche de Langmuir et conduit à la condensation de celle-ci (Rhodes et Liu, J., 1996). Malgré que la protéine soit chargée, il est peu probable qu'un tel effet se produit car une monocouche de POPC n'a pas de charge nette. Ainsi, la décroissance observée est vraisemblablement due à l'extraction des lipides de la monocouche par la protéine.

En supposant que les molécules de protéines ne contribuent pas significativement à l'aire de l'interface en s'y insérant, la décroissance observée correspond à l'extraction des lipides à un rythme moyen d'environ 10^{11}

molécules/s. Dans les conditions expérimentales utilisées, la sous-phase contient approximativement 10^{16} monomères de BSP-A1/A2. Puisqu'il est généralement admis qu'une dizaine de molécules de phosphocholine se lie à un monomère de BSP-A1/A2 (Ramakrishnan et al., 2001; Gasset et al., 2000; Müller et al., 1998), l'extraction des lipides nécessiterait alors $\sim 10^{10}$ protéines/s. Ainsi, il y a un grand excès de protéine dans la sous-phase faisant en sorte que la concentration de BSP-A1/A2 ne varie pas significativement sur la durée de l'expérience. Cette constatation est compatible avec la décroissance quasi linéaire observée et qui suggère une réaction de pseudo ordre zéro.

Les étapes menant à l'extraction des lipides de la monocouche de POPC ne sont pas connues, mais les informations recueillies sur l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les lipides (voir **Chapitre 1, Section 1.3**) permettent d'émettre certaines hypothèses. La première étape est évidemment l'atteinte de l'interface. Or, la protéine aurait des cavités hydrophobes exposées au milieu aqueux qui lui confèrent un caractère amphiphile (Desnoyers and Manjunath, P., 1993; Seidah et al., 1987). Ainsi, il y a possiblement des interactions hydrophobes entre ces cavités et la région apolaire de la couche constituée des chaînes acyles des lipides qui favorisent l'interaction de la protéine avec la monocouche. Cette association pourrait aussi inclure la reconnaissance de la tête polaire de la POPC par la protéine. L'étude de la structure cristalline du complexe BSP/o-PC (la choline soluble) se ferait via deux sites de liaison bien définis (Wah et al., 2002). Cependant, il est impossible d'extrapoler avec certitude que la liaison de la protéine aux membranes se fait de la même manière (voir **Chapitre 1, Section 1.3**). Or, le comportement de la monocouche est vraisemblablement plus près de celui d'une bicouche que de la choline libre en solution et, à ce point, il est impossible d'évaluer la contribution d'une telle reconnaissance moléculaire. La disparition des lipides de l'interface implique la formation d'un complexe BSP/POPC stable dans la sous-phase aqueuse. Il peut y avoir la formation de complexes dont la taille est de l'ordre de quelques dizaines de nm, comme il a déjà été rapporté (Gasset et al., 2000). Il a été observé que la protéine liée se réarrange

de façon à ce que ses liaisons peptidiques soient davantage exposées au solvant (Gasset et al., 1997), ce qui a pour effet d'accroître sa polarité. Ainsi, ces parties peuvent servir, en partie, d'interface entre la région apolaire de ces complexes et l'eau. Ceci mène même à une forme stabilisée de la BSP-A1/A2 sous sa forme liée (Gasset et al., 1997). À la lumière des observations en microscopie de fluorescence, l'extraction des lipides sous forme de tubes ou de petites vésicules est aussi envisageable. La formation de ces structures nécessite les deux feuilletts de la bicouche. Les déformations sont induites par un débalancement des aires des deux feuilletts (Staneva et al., 2004; Staneva et al., 2005; Tanaka et al., 2002; Lee, 2005; Mui et al., 1995). Ainsi, un tel mécanisme nécessite la formation préalable d'une bicouche à partir de la monocouche pour que l'extraction des lipides se produise sous forme de tubes ou de petites vésicules.

L'accroissement de l'aire mesurée suite à l'interaction entre la BSP-A1/A2 avec une monocouche de POPC/Chol (7/3 mol/mol) implique qu'il y a une augmentation de la quantité de molécules à l'interface car la barrière doit s'ouvrir afin de maintenir la pression de surface constante. En considérant que toutes les molécules de lipides formant la monocouche demeurent à l'interface, le nombre accru de molécules à l'interface air-eau ne peut s'expliquer autrement que par l'association de la protéine à la monocouche. Il est intéressant de constater que la présence de cholestérol influence considérablement la nature des interactions entre la protéine et les lipides, malgré le fait que la BSP-A1/A2 n'interagisse pas directement avec le cholestérol (Desnoyers and Manjunath, P., 1992; Moreau and Manjunath, P., 1999; Müller et al., 2002).

La présence de cholestérol dans une membrane augmente l'épaisseur et la rigidité de celle-ci, ce qui peut modifier la façon dont la protéine s'y lie (Douliez et al., 1996; Li et al., 2001). Effectivement, la présence de cholestérol peut faire en sorte que la protéine ne puisse s'insérer à la même profondeur ou dans la même orientation que dans une couche dépourvue de cholestérol (Pott and Dufourc, E.J., 1995; Monette et al., 1993). Il est à noter que la technique de Langmuir mesure

une variation nette de l'aire interfaciale. Ainsi, il n'est pas possible d'affirmer qu'il n'y a qu'association de la protéine et aucune extraction des lipides. Les deux phénomènes pourraient avoir lieu simultanément, mais globalement l'association de la protéine semble être la contribution principale (ou même la seule) à la variation de l'aire interfaciale. Finalement, seules des études structurales plus détaillées permettraient de déterminer les détails de l'association de la protéine aux structures lipidiques contenant ou non du cholestérol.

D'autre part, il est possible que la présence du cholestérol nuise à la formation de complexes lipide-protéine. Par exemple, le cholestérol conduit à une augmentation de l'épaisseur de la membrane. Il est bien établi que la bonne concordance entre la portion hydrophobe de la protéine et celle des lipides est un paramètre fondamental des interactions lipide-protéine (Mouritsen and Bloom, M., 1984). Une augmentation de l'épaisseur de la couche de lipides en présence de cholestérol pourrait perturber la concordance hydrophobe entre la longueur du segment hydrophobe de la protéine et la zone apolaire de la couche lipidique. Un tel phénomène a déjà été observé lors de la formation des complexes de la mélittine, une toxine du venin d'abeille, et les lipides. La présence de cholestérol inhibait la formation de petits complexes mélittine/lipide (Benachir et al., 1997) et, de plus, les complexes résultants étaient appauvris en cholestérol par rapport à la composition de la bicouche initiale (Pott and Dufourc, E.J., 1995). De manière analogue, il est possible que la rigidification du feuillet lipidique qu'induit le cholestérol (Li et al., 2001) soit défavorable à la formation de structures adoptées par la couche lipidique lors de l'extraction des lipides de l'interface. Il n'y a pas que l'effet de la BSP-A1/A2 qui serait affectée par la présence de cholestérol dans la membrane. Par exemple, l'interaction entre la mélittine et les membranes en est aussi modifiée. Ce peptide amphiphile, provenant du venin d'abeille, est reconnu pour induire la lyse des membranes (Dempsey, 1990). Or, la présence de ~30% (mol/mol) de cholestérol dans les membranes inhibe ce phénomène (Monette et al., 1993). L'effet de la mélittine serait régi principalement par les propriétés physiques de la membrane qui sont modifiées par la présence de cholestérol.

Notamment, la rigidification de la membrane par le cholestérol nuit à la liaison du peptide menant à la lyse (Monette et al., 1993). Aussi, l'épaisseur de la bicouche est déterminante dans la formation de petits objets en forme de disque (Pott and Dufourc, E.J., 1995). Plusieurs études concluent à la formation de telles particules, formées de lipides organisés en bicouches planes stabilisées par plusieurs molécules de mélittine (Dufourcq et al., 1986; Dempsey, 1990; Pott and Dufourc, E.J., 1995). Les peptides se placent vis-à-vis les bords hydrophobes de la bicouche afin de les isoler du milieu polaire. Les peptides ayant une longueur définie, ils sont en mesure de stabiliser des bicouches d'une certaine épaisseur ($\sim 40 \text{ \AA}$) (Pott and Dufourc, E.J., 1995). Or, le contenu en cholestérol de la membrane en modifie l'épaisseur. Ainsi, le cholestérol peut contribuer à stabiliser de telles particules, mais aussi diminuer l'affinité de la mélittine pour les membranes. Cet exemple soulève la possibilité que l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les membranes soit régie par leurs propriétés physiques plutôt que par la nature chimique des lipides qui les composent.

Les résultats obtenus pour ces deux types de monocouches (POPC avec et sans cholestérol) sont en accord des observations en SPR (Thomas et al., 2003). Cette étude conclut que la BSP-A1/A2 est capable d'extraire les lipides d'une monocouche de PC et que l'incorporation de cholestérol inhibe ce phénomène. Une augmentation subite du signal SPR a été enregistrée lorsque la protéine interagit avec une monocouche de DMPC pure. Cependant, le signal diminue légèrement plutôt que d'atteindre un plateau de saturation. Ceci indique une perte de matière à la surface correspondant probablement à l'extraction des lipides formant la monocouche (Thomas et al., 2003). Il est à noter que les expériences en SPR démontrent des variations de signal se produisant sur quelques minutes, soit une échelle de temps considérablement plus courte que celle des expériences effectuées lors de la présente étude (quelques heures). Il est intéressant de souligner que l'usage de concentrations de protéines ~ 100 fois plus élevées en SPR pourrait expliquer cette différence de taux d'extraction, ce qui serait en accord avec la réaction de pseudo-ordre 0 indiquée plus haut. Une autre étude est

également en accord avec les observations de la présente étude et celles de l'étude SPR. Des expériences en fluorescence ont montré que la BSP-A1/A2 induit des fuites dans les membranes de phosphocholine et que la présence d'environ 30% (mol/mol) de cholestérol diminue cet effet de façon importante (Gasset et al., 2000).

En conclusion, la BSP-A1/A2 induit une diminution de l'aire d'une monocouche de POPC et une augmentation de celle d'une monocouche de POPC/Chol (7/3 mol/mol). Selon les théories existantes, ceci signifie qu'on observerait la formation de vésicules invaginées lorsque la protéine interagit avec des membranes de POPC et qu'on observerait des structures tubulaires pour les membranes de POPC/Chol (7/3 mol/mol) (voir **Chapitre 3, Figure 3.6**). Or, la BSP-A1/A2 a clairement entraîné la déformation de vésicules de POPC en structures tubulaires (voir **Chapitre 3, Figure 3.2**). Ainsi, le mécanisme menant aux changements morphologiques des membranes est complexe et la monocouche de Langmuir ne constitue pas un bon modèle pour représenter les membranes lors de leurs interactions avec la BSP-A1/A2. Cette association nécessite vraisemblablement la présence des deux feuilletts de la bicouche. Quoiqu'il en soit, cette étude a montré que la présence de cholestérol dans les systèmes lipidiques ne doit pas être négligée. Même si la protéine n'interagit pas directement avec le cholestérol, les résultats obtenus par la technique de Langmuir indiquent que sa présence modifie considérablement les interactions entre la BSP-A1/A2 et les lipides. De plus, cette étude confirme que l'association de la protéine avec les membranes est beaucoup plus complexe qu'une simple reconnaissance spécifique de la choline dans un site de liaison bien défini. Les observations discutées ci-haut montrent que les propriétés physiques des membranes jouent un rôle crucial dans leur association à la BSP-A1/A2 et des modifications membranaires qui en résultent. Évidemment, la composition des membranes des spermatozoïdes est beaucoup plus complexe que celle des systèmes étudiés ici. Cependant, les nombreux constituants de la membrane pourraient lui conférer des propriétés physiques optimisées pour son interaction avec la protéine.

Chapitre 5 : Conclusion générale

L'association de la BSP-A1/A2 aux membranes a été caractérisée par ITC. Il s'agit d'un phénomène exothermique à 37 °C et l'enthalpie de liaison varie avec la composition des membranes. L'ordre d'affinité de la protéine pour les divers systèmes est le suivant : PC/PE > PC ~ PG >> PC/Chol. Cette étude est la première à démontrer que la présence de PE dans les membranes de PC augmente l'affinité de la protéine. Or, il a été démontré que la protéine ne reconnaît pas la PE soluble. Ainsi, il semble que ce soient les propriétés physico-chimiques de la membrane de PC/PE qui favorisent la liaison de la protéine. Il a également été mis en évidence que la présence de cholestérol nuit à l'association de la protéine en modifiant les propriétés de la membrane. Ces observations sont très intéressantes puisque la PE et le cholestérol sont présents dans les membranes des spermatozoïdes et leur distribution est modifiée lors de l'association de la protéine à la membrane.

L'intégrité des membranes suite à leur interaction avec la BSP-A1/A2 a également été étudiée. La microscopie de fluorescence a permis d'observer les modifications morphologiques que cette association induit. Des structures en collier et des longs tubes ont été observés pour des MLV de POPC. Pour des membranes de POPC contenant 30 % (mol/mol) de cholestérol, les structures étaient beaucoup moins fréquentes. Ceci confirme les observations en ITC qui indiquent que le cholestérol nuit à l'association de la protéine aux membranes. Les déformations observées se produisent afin de stabiliser la membrane suite à un déséquilibre des aires des feuillet de la bicouche. Plus précisément, les structures observées découlent d'une augmentation de l'aire du feuillet externe. Ainsi, il semble que la protéine induit des modifications morphologiques en se liant à ce feuillet. Il existe des transitions morphologiques menant aux diverses structures observées. Cette technique simple s'avère très prometteuse afin d'observer les transitions morphologiques *in situ* et, surtout, en temps réel. Elle

pourrait éventuellement être utilisée afin d'observer l'effet de la BSP-A1/A2 sur les spermatozoïdes plutôt que sur les membranes modèles.

L'interaction de la protéine avec les monocouches de Langmuir a été examinée afin de confirmer l'augmentation d'aire prédite par cette théorie. Cette technique a indiqué que, effectivement, la protéine augmente l'aire de la monocouche de POPC/Chol (7/3 mol/mol), vraisemblablement en s'y insérant. Cependant, une diminution de l'aire a été mesurée pour une monocouche de POPC pure. Cette observation va à l'encontre de ce qui a été observé en microscopie de fluorescence. Ainsi, il en a été déduit que l'interaction entre la BSP-A1/A2 et les membranes est complexe et que le modèle de la monocouche n'est pas idéal pour étudier cette association. Effectivement, il semble que la présence des deux feuilletts soit nécessaire à la liaison de la protéine.

Somme tout, la présente étude a permis de mettre en évidence la complexité de l'interaction de la BSP-A1/A2 avec les membranes. Plus particulièrement, la modulation de l'affinité de la protéine selon les propriétés physico-chimiques des membranes est un élément important. De plus, les modifications morphologiques observées ont permis d'obtenir davantage d'informations sur le mécanisme de la liaison protéine/lipide. Effectivement, la protéine se lie au feuillet externe de la bicouche. Il faut cependant noter que le feuillet interne contribue d'une certaine façon à la liaison de la protéine, probablement par des interactions hydrophobes entre la protéine et les chaînes apolaires des lipides de ce feuillet.

Bibliographie

- Anbazhagan, V. and M.J. Swamy. 2005. Thermodynamics of phosphorylcholine and lysophosphatidylcholine binding to the major protein of bovine seminal plasma, PDC-109. *FEBS Letters* 579:2933-2938.
- Baker, M.E. 1985. The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and a Kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 130:1010-1014.
- Benachir, T., M. Monette, J. Grenier, and M. Lafleur. 1997. Melittin-induced leakage from phosphatidylcholine vesicles is modulated by cholesterol: a property used for membrane targeting. *European Biophysical Journal* 25:201-210.
- Beschiaschvili, G. and J. Seelig. 1990. Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/ phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* 29:52-58.
- Bos, M.A. and T. Nylander. 1996. Interaction between beta-lactoglobulin and phospholipids at the air/water interface. *Langmuir* 12:2791-2797.
- Breukink, E., P. Ganz, B. de Kruijff, and J. Seelig. 2000. Binding of nisin to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* 39:10247-10254.
- Brown, D.A. and E. London. 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membrane Biol.* 164:103-114.
- Calvete, J.J., A. Campanero-Rhodes, M. Raida, and L. Sanz. 1999. Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS Letters* 444:260-264.
- Constantine, K.L., M. Madrid, L. Banyai, M. Trexler, L. Patthy, and M. Llinas. 1992. Refined solution structure and ligand-binding properties of PDC-109 domain b. *Journal of Molecular Biology* 223:281-298.
- Constantinescu, I. and M. Lafleur. 2004. Influence of the lipid composition on the kinetics of concerted insertion and folding of melittin in bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1667:26-37.
- Davis, B.K. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7560-7564.

- De Kruijff, B., P.R. Cullis, and G.K. Radda. 1975. Differential scanning calorimetry and ^{31}P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 406:6-20.
- Dempsey, C.E. 1990. The actions of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1031:143-161.
- Desnoyers, L. and P. Manjunath. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 267:10149-10155.
- Desnoyers, L. and P. Manjunath. 1993. Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 305:341-349.
- Desnoyers, L., I. Thérien, and P. Manjunath. 1994. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Molecular Reproduction and Development* 37:425-435.
- Douliez, J.-P., A. Léonard, and E.J. Dufourc. 1996. Conformational order of DMPC sn-1 versus sn-2 chains and membrane thickness: an approach to molecular protrusion by solid state ^2H -NMR and neutron diffraction. *Journal of Physical Chemistry* 100:18450-18457.
- Dufourcq, J., J.-F. Faucon, G. Fourche, J.-L. Dasseux, M. Le Maire, and T. Gulik-Krzywicki. 1986. Morphological changes of phosphatidylcholine bilayers induced by melittin: vesicularization, fusion, discoidal particles. *Biochimica et Biophysica Acta* 859:33-48.
- El Jastimi, R., K. Edwards, and M. Lafleur. 1999. Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membranes. *Biophysical Journal* 77:842-852.
- Esch, F.S., N.C. Ling, P. Bohlen, S.Y. Ying, and R. Guillemin. 1983. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 113:861-867.
- Fan, J., J. Lefebvre and P. Manjunath. 2006. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. *Gene* 375:63-74.
- Fiske, C.H. and Y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66:375-400.
- Gasset, M., L. Magdaleno, and J.J. Calvete. 2000. Biophysical study of the perturbation of model membrane structure caused by seminal plasma protein PDC-109. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374:241-247.

- Gasset, M., J.L. Saiz, J. Laynez, L. Sanz, M. Gentzel, E. Töpfer-Petersen, and J.J. Calvete. 1997. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *European Journal of Biochemistry* 250:735-744.
- Gennis, R.B. 1989. Biomembranes molecular structure and function. Springer-Verlag, New York.
- Greube, A., K. Müller, E. Töpfer-Petersen, A. Herrmann, and P. Müller. 2001. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry* 40:8326-8334.
- Heerklotz, H., H. Lantzsch, H. Binder, G. Klose, and A. Blume. 1996. Thermodynamic characterization of dilute aqueous lipid/detergent mixtures of POPC and C₁₂EO₈ by means of isothermal titration calorimetry. *Journal of Physical Chemistry* 100:6764-6774.
- Heerklotz, H. and J. Seelig. 2000. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1508:69-85.
- Heerklotz, H.H., H. Binder, and H. Schmiedel. 1998. Excess enthalpies of mixing in phospholipid-additive membranes. *Journal of Physical Chemistry B* 102:5363-5368.
- Hildebrand, A., R. Neubert, P. Garidel, and A. Blume. 2002. Bile salt induced solubilization of synthetic phosphatidylcholine vesicles studied by isothermal titration calorimetry. *Langmuir* 18:2836-2847.
- Hotani, H., F. Nomura, and Y. Suzuki. 1999. Giant liposomes: from membrane dynamics to cell morphogenesis. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 4:358-368.
- Keller, M., A. Kerth, and A. Blume. 1997. Thermodynamics of interaction of octyl glucoside with phosphatidylcholine vesicles: partitioning and solubilization as studied by high sensitivity titration calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1326:178-192.
- Kyte, J. and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157:105-132.
- Lassiseraie, D. 2006. Protéines du liquide séminal bovin et les membranes lipidiques modèles : étude des interactions par titrage calorimétrique et spectroscopie infrarouge. Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal, Montréal.
- Lau, A., A. McLaughlin, and S. McLaughlin. 1981. The adsorption of divalent cations to phosphatidylglycerol bilayer membranes. *Biochimica et*

Biophysica Acta 645:279-292.

- Lee, A.G. 2005. Lipid sorting: lipids do it on their own. *Current Biology* 15:R421-R423
- Li, X.-M., M.M. Momsen, J.M. Smaby, H.L. Brockman, and R.E. Brown. 2001. Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins. *Biochemistry* 40:5954-5963.
- Manjunath, P., L. Baillargeon, Y.L. Marcel, N.G. Seidah, M. Chrétien, and A. Chapdelaine. 1988. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*. Plenum Publishing Corp., New-York. 259-273.
- Manjunath, P., L. Chandonnet, E. Leblond, and L. Desnoyers. 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction* 50:27-37.
- Manjunath, P. and M.R. Sairam. 1987. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A₁, BSP-A₂ and BSP-A₃) from bovine seminal plasma. *Biochemical Journal* 241:685-692.
- Manjunath, P., M.R. Sairam, and J. Uma. 1987. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Bioscience Reports* 7:231-238.
- Manjunath, P. and I. Thérien. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* 53:109-119.
- Marsh, D. 1996. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1286:183-223.
- Marsh, D. 1990. *CRC Handbook of lipid bilayers*. CRC Press, Boca Raton.
- Matti, V., J. Saily, J. Ryhanen, J.M.B.S. Holopainen, G. Mancini, and P.K.J. Kinnunen. 2001. Characterisation of mixed monolayers of phosphatidylcholine and a dicationic gemini surfactant SS-1 with a Langmuir balance : effects of DNA. *Biophysical Journal* 81:2135-2143.
- Monette, M., M.-R. Van Calsteren, and M. Lafleur. 1993. Effect of cholesterol on the polymorphism of dipalmitoylphosphatidylcholine/melittin complexes: an NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1149:319-328.
- Moreau, R., P.G. Frank, C. Perreault, Y.L. Marcel, and P. Manjunath. 1999. Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux. *Biochimica et Biophysica Acta* 1438:38-46.

- Moreau, R. and P. Manjunath. 1999. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1438:175-184.
- Moreau, R. and P. Manjunath. 2000. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1487:24-32.
- Moreau, R., I. Thérien, C. Lazure, and P. Manjunath. 1998. Type II domains of BSP-A1/-A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246:148-154.
- Mouritsen, O.G. and M. Bloom. 1984. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical Journal* 46:141-153.
- Mui, B.L.S., H.-G. Dobereiner, T.D. Madden, and P.R. Cullis. 1995. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophysical Journal* 69:930-941.
- Müller, P., K.R. Erlemann, K. Müller, J.J. Calvete, E. Töpfer-Petersen, K. Marienfeld, and A. Herrmann. 1998. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *European Biophysical Journal* 27:33-41.
- Müller, P., A. Greube, E. Topfer-Petersen, and A. Hermann. 2002. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on cholesterol in the presence of phospholipids. *European Biophysical Journal* 31:438-447.
- Nauc, V. and P. Manjunath. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction* 63:1058-1066.
- Nayar, R., M.J. Hope, and P. Cullis. 1989. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochimica et Biophysica Acta* 986:200-206.
- Nolan, J.P. and R.H. Hammerstedt. 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB Journal* 11:670-682.
- Parks, J.E. and R.H. Hammerstedt. 1985. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction* 32:653-668.
- Percot, A., X.X. Zhu, and M. Lafleur. 1999. Design and characterization of anchoring amphiphilic peptides and their interactions with lipid vesicles. *Biopolymers* 50:647-655.

- Pétriart, F., E. Roux, J.-C. Leroux, and S. Giasson. 2004. Study of molecular interactions between a phospholipidic layer and a pH-sensitive polymer using the Langmuir Balance Technique. *Langmuir* 20:1393-1400.
- Pott, T. and E.J. Dufourc. 1995. Action of melittine on the DPPC-Cholesterol liquid-ordered phase: A solid state ^2H - and ^{31}P -NMR Study. *Biophysical Journal* 68:965-977.
- Ramakrishnan, M., V. Anbazhagan, T.V. Pratap, D. Marsh, and M.J. Swamy. 2001. Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Biophysical Journal* 81:2215-2225.
- Rex, S. and G. Schwarz. 1998. Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. *Biochemistry* 37:2336-2345.
- Rhodes, D.G. and J. Liu. 1996. Divalent cation mediated binding of oligonucleotides to langmuir monolayers of charged lipides. *Langmuir* 12:1879-1883.
- Sanchez, J. and A. Badia. 2003. Atomic force microscopy studies of lateral phase separation in mixed monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and dilauroylphosphatidylcholine. *Thin Solid Films* 440:223-239.
- Seelig, J. 1997. Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1331:103-116.
- Seelig, J., S. Nebel, P. Ganz, and C. Bruns. 1993. Electrostatic and nonpolar peptide-membrane interactions. Lipid binding and functional properties of somatostatin analogues of charge $z = +1$ to $z = +3$. *Biochemistry* 32:9714-9721.
- Seidah, N.G., P. Manjunath, J. Rochemont, M.R. Sairam, and M. Chrétien. 1987. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. *Biochemical Journal* 243:195-203.
- Selivonchick, D.P., P. Schid, V. Natarajan, and H.H.O. Schid. 1980. Structure and metabolism of phospholipids in bovine epididymal spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 618:242-254.
- Shaikh, S.R., M.R. Brzustowicz, N. Gustafson, W. Stillwell, and S.R. Wassal. 2002. Monounsaturated PE does not phase-separate from the lipid raft molecules sphingomyelin and cholesterol: Role for polyunsaturation? *Biochemistry* 41:10593-10602.
- Staneva, G., M.I. Angelova, and K. Koumanov. 2004. Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 129:53-62.

- Staneva, G., M. Seigneuret, K. Koumanov, G. Trugnan, and M.I. Angelova. 2005. Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles. A direct microscopy observation. *Chemistry and Physics of Lipids* 136:55-66.
- Sticht, H., A.R. Pickford, J.R. Potts, and I.D. Campbell. 1998. Solution structure of the glycosylated second type 2 module of fibronectin. *Journal of Molecular Biology* 276:177-187.
- Swamy, M.J., D. Marsh, V. Anbazhagan, and M. Ramakrishnan. 2002. Effect of cholesterol on the interaction of seminal plasma protein, PDC-109 with phosphatidylcholine membranes. *FEBS Letters* 528:230-234.
- Tanaka, T., Y. Tamba, S.M. Masum, Y. Yamashita, and M. Yamazaki. 2002. La^{3+} and Gd^{3+} induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1564:173-182.
- Thérien, I., R. Moreau, and P. Manjunath. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction* 59:768-776.
- Thérien, I., R. Moreau, and P. Manjunath. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction* 61:590-598.
- Thérien, I., S. Soubeyrand, and P. Manjunath. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biology of Reproduction* 57:1080-1088.
- Thomas, C.J., V. Anbazhagan, M. Ramakrishnan, N. Sultan, I. Surolia, and M.J. Swamy. 2003. Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasmon resonance study. *Biophysical Journal* 84:3037-3044.
- Ulman, A. 1991. An introduction to ultrathin organic films, from Langmuir-Blodgett to self-assembly. Academic Press, San Diego.
- Wah, D.A., C. Fernandez-Tornero, L. Sanz, A. Romero, and J.J. Calvete. 2002. Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-Phosphorylcholine complex. *Structure* 10:505-514.
- Wenk, M.R. and J. Seelig. 1997. Interaction of octyl- β -thioglucopyranoside with lipid membranes. *Biophysical Journal* 73:2565-2574.
- Wenk, M.R. and J. Seelig. 1998. Magainin 2 amide interaction with lipid membranes: calorimetric detection of peptide binding pore formation. *Biochemistry* 37:3909-3916.

- Wieprecht, T., O. Apostolov, and J. Seelig. 2000. Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles. *Biophysical Chemistry* 85:187-198.
- Wieprecht, T., M. Beyermann, and J. Seelig. 1999. Binding of antibacterial magainin peptides to electrically neutral membranes: thermodynamics and structure. *Biochemistry* 38:10377-10387.
- Yun, H., Y.-W. Choi, N.J. Kim, and D. Sohn. 2003. Physicochemical properties of phosphatidylcholine (PC) monolayers with different alkyl chains, at the air/water interface. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24:377-383.