

Université de Montréal

Protéines du liquide séminal bovin et membranes lipidiques modèles : étude  
des interactions par titrage calorimétrique isotherme et spectroscopie  
infrarouge

par  
Danny Lassiseraye

Département de chimie  
Faculté des Arts et des Sciences

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

Mai 2006

© Danny Lassiseraye, 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 :

Protéines du liquide séminal bovin et membranes lipidiques modèles : étude  
des interactions par titrage calorimétrique isotherme et spectroscopie  
infrarouge

présenté par :  
Danny Lassiseraye

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christian Reber  
(Président-rapporteur)

Michel Lafleur  
(Directeur de recherche)

Puttaswamy Manjunath  
(Co-directeur)

Françoise Winnik  
(Membre du jury)

## Résumé

Ce travail porte sur l'étude des interactions entre des protéines du liquide séminal bovin (protéines BSP) et les membranes lipidiques modèles. Ces protéines extraient spécifiquement des membranes la phosphatidylcholine et le cholestérol. Ce changement de composition lipidique est une étape clé dans la capacitation des spermatozoïdes. La littérature relate que les protéines BSP possèdent une affinité particulière pour les lipides qui contiennent la partie choline. À l'aide du titrage calorimétrique isotherme (ITC, Isothermal Titration Calorimetry), nous avons déterminé l'affinité de ces protéines pour quatre systèmes lipidiques : POPC/POPE > POPC/POPG > POPC > POPC/Cholestérol. Une des principales conclusions de ce travail est que l'extraction de lipides ne se fait pas par une reconnaissance moléculaire de groupement fonctionnel tel la choline. Un important effet de la température sur l'interaction a également été observé. Des titrages ont été effectués pour caractériser la complexation des protéines BSP avec une lipoprotéine du jaune d'œuf, LDL, qui serait impliquée dans la cryopréservation des semences. Les résultats suggèrent que les protéines BSP se lient à la partie lipidique des LDL, ouvrant une voie à la compréhension du rôle du jaune d'œuf dans la protection des spermatozoïdes. Des expériences complémentaires en spectroscopie infrarouge ont montré une évolution de la structure des protéines BSP en fonction de la température. L'association des protéines BSP à des membranes de DMPC ne provoque que peu de changements structuraux des protéines. Lorsque DMPG est incorporé aux membranes de DMPC, la température de transition de phase des deux lipides augmente avec la concentration de protéines BSP dans le mélange. Cette augmentation n'a pas été observée avec DMPC seule, suggérant un rôle important des charges négatives lors de l'interaction.

Mots clés : protéines BSP, titrage calorimétrique isotherme, membranes lipidiques, spectroscopie infrarouge, affinité.

## Abstract

This work is about interactions between bovine seminal plasma proteins (BSP proteins) and model lipid membranes. These proteins specifically extract phosphatidylcholine and cholesterol from membranes. This change in lipid composition is a key step in the capacitation of sperm cells. It is known that these proteins have a specific affinity for membranes containing choline phospholipids. With isothermal titration calorimetry (ITC), we found the following affinities for four lipid systems: POPC/POPE > POPC/POPG > POPC > POPC/Cholesterol. A major conclusion of this work is that the lipid extraction is not the result of a specific molecular recognition of a functional group like choline. An important effect of temperature on the binding is also being reported. Titrations have been made to characterize the binding of BSP proteins to the low-density lipoproteins (LDL) of egg yolk. It has been found that the BSP proteins bind to the lipid part of LDL, suggesting a way to the understanding of the role of egg yolk in sperm cell protection. Complementary FT-IR studies showed the evolution of BSP proteins structure as a function of temperature. The binding to DMPC membranes did not show important protein structure change. When DMPG is inserted in DMPC membranes, the phase transition temperatures of both lipids is increased with protein concentration in the mixture. This effect has not been reported with DMPC alone, suggesting an important role of negative charges in the binding.

Key words: BSP proteins, isothermal titration calorimetry, lipid membranes, FT-IR, affinity.

## Table des matières

<b>Page titre</b>	<b>i</b>
<b>Jury</b>	<b>ii</b>
<b>Résumé</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>x</b>
<b>Liste des symboles et abréviations</b>	<b>xv</b>
<b>Remerciements</b>	<b>xviii</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Protéines BSP</i>	1
1.2 <i>Bicouches lipidiques</i>	3
1.3 <i>Interactions protéines BSP/lipides</i>	4
1.4 <i>LDL (Low-density lipoproteins) du jaune d'oeuf</i>	7
1.5 <i>Titrage calorimétrique isotherme</i>	8
1.5.1 <i>La technique</i>	8
1.5.2 <i>Modèles pour analyser les interactions</i>	
<i>BSP-membranes</i>	10
1.5.2.1 <i>Coefficient de partage</i>	10
1.5.2.2 <i>Modèle d'affinité selon Scatchard</i>	13
1.6 <i>Spectroscopie infrarouge</i>	13
1.6.1 <i>Région Amide I</i>	13
1.6.2 <i>Élongation <math>\nu_{CH}</math> des phospholipides</i>	15

1.6.3 <i>Spectroscopie Infrarouge à deux dimensions</i>	17
1.7 <i>Problématique</i>	18
<b>Chapitre 2 : Spécificité lipidique et effet de la température lors de l'association des protéines BSP à des membranes lipidiques</b>	20
2.1 <i>Introduction</i>	20
2.2 <i>Matériel et méthodes</i>	20
2.2.1 <i>Produits chimiques</i>	20
2.2.2 <i>Titration calorimétrique isotherme (ITC)</i>	20
2.3 <i>Résultats</i>	22
2.3.1 <i>Titration calorimétrique isotherme (ITC)</i>	22
2.3.2 <i>Isothermes d'association</i>	29
2.3.3 <i>Graphiques de type Scatchard</i>	30
2.3.4 <i>Coefficient de partage</i>	32
2.4 <i>Discussion</i>	33
2.4.1 <i><math>\Delta H_{mol}</math> et ratio lipides/BSP liée</i>	33
2.4.2 <i>Affinité selon le modèle de Scatchard</i>	34
2.4.3 <i>Affinité selon le modèle du coefficient de partage</i>	35
2.4.4 <i>Affinité pour les bicouches lipidiques</i>	36
2.4.4.1 <i>Affinité avec POPC</i>	36
2.4.4.2 <i>Effet de POPG sur l'affinité</i>	37
2.4.4.3 <i>Effet de POPE sur l'affinité</i>	38
2.4.4.4 <i>Effet du cholestérol sur l'affinité</i>	39
2.4.5 <i>Influence de la température sur l'association des protéines BSP aux lipides</i>	40



2.5 <i>Conclusions</i>	42
<b>Chapitre 3 : Spectroscopie infrarouge des protéines BSP et des interactions BSP/lipides</b>	45
3.1 <i>Introduction</i>	45
3.2 <i>Matériel et méthodes</i>	45
3.2.1 <i>Produits chimiques</i>	45
3.2.2 <i>Spectroscopie infrarouge</i>	45
3.2.3 <i>Microcalorimétrie à balayage</i>	48
3.3 <i>Résultats</i>	49
3.3.1 <i>Dénaturation des protéines BSP en solution</i>	48
3.3.2 <i>Dénaturation des protéines BSP en présence de phospholipides</i>	53
3.3.3 <i>Effet des protéines BSP sur la transition de phase des lipides</i>	57
3.3.4 <i>Spectroscopie infrarouge à deux dimensions</i>	63
3.4 <i>Conclusions</i>	67
3.4.1 <i>Spectroscopie infrarouge à une dimension</i>	67
3.4.2 <i>Spectroscopie infrarouge à deux dimensions</i>	68
<b>Chapitre 4 : Interactions entre les protéines BSP et LDL</b>	69
4.1 <i>Introduction</i>	69
4.2 <i>Matériel et méthodes</i>	70
4.3 <i>Résultats</i>	71
4.4 <i>Discussion et conclusion</i>	73
<b>Chapitre 5 : Conclusions</b>	75
<b>Références</b>	83

## Liste des tableaux

*Chapitre 2*

- |      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | Saturation de la membrane (lipides/BSP), et enthalpie molaire d'association pour les titrages des 4 systèmes lipidiques étudiés, à 37°C.  | 24 |
| II.  | Constantes de dissociation (K) et nombre de lipides par site (n) obtenus à l'aide du modèle de Scatchard, à 37°C.   | 30 |
| III. | Coefficients de partage et charge effective de la protéine pour l'association des protéines BSP aux 4 systèmes lipidiques étudiés. L'incertitude sur les valeurs provient de duplicata.<br>a : Valeur attribuée seulement au transfert de la protéine dans la membrane lipidique.<br>b : Valeur incluant les interactions électrostatiques et le transfert de la protéine dans la membrane lipidique au début du titrage. | 32 |
| IV.  | Résumé des effets de l'insertion de différents lipides dans les membranes de POPC lors de l'association avec les protéines BSP.   | 43 |

*Chapitre 3*

- V. Attribution de chacune des composantes spectrales simulées et leurs pourcentages respectifs à 20 et 70°C pour la protéine libre en solution. 51
- VI. Attribution de chacune des composantes spectrales simulées en présence de DMPC et leurs pourcentages respectifs à 20 et 70°C. 55

## Liste des figures

### *Chapitre 1*

- |     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.1 | Structure primaire de BSP-A1/A2  | 3  |
| 1.2 | La transition de la phase gel à la phase liquide cristalline d'une bicouche de phospholipides.   | 4  |
| 1.3 | Mode de vibration de la bande Amide I.   | 14 |
| 1.4 | Région Amide I' du spectre de la protéine BSP en solution.   | 14 |
| 1.5 | Augmentation de la fréquence des bandes associées aux élongations C-H des chaînes acyles de la DMPC lors de son passage de la phase gel à la phase liquide cristalline (T = 23°C).   | 16 |
| 1.6 | A) Schéma d'une carte IR-2D synchrone. Les régions ombragées représentent les régions d'intensité négative. Les fluctuations dynamiques sont sur la diagonale, alors que les pics croisés sont hors diagonale. B) Schéma d'une carte IR-2D asynchrone. | 18 |

### *Chapitre 2*

- |     |  |  |
|-----|--|--|
| 2.1 | Titration calorimétrique isotherme de vésicules de POPC par des protéines BSP à A) 10°C (POPC 5 mM; BSP 0.2 mM - 14 injections de 20 µL), B) 20°C (POPC 5 mM; BSP 0.2 mM - 14 injections de 20 µL), et C) 37°C (POPC 0.5 mM; BSP 0.2 mM - 7 injections |  |
|-----|--|--|

de 40  $\mu$ L). La partie du haut du thermogramme montre les changements dans le flux de chaleur qui résultent des injections. La partie du bas montre l'enthalpie totale d'association calculée. Les contributions endo-(■) et exo-(●)thermiques sont montrées séparément.

22

2.2 Injection de BSP (40  $\mu$ L/injection d'une solution de concentration 0,1 mM) sur des vésicules de POPC (10 mM). Les 7 premières injections sont à 20°C, les 7 autres à 37°C. La ligne pointillée indique le changement de température. Les 7 dernières injections débutent à un temps arbitraire de 600 minutes.

26

2.3 Titration calorimétrique isotherme de vésicules de POPC/POPG (7/3) par des protéines BSP A) à 20°C (lipides 5 mM ; BSP 0.2 mM – 14 injections de 20  $\mu$ l) et B) à 37°C (lipides 0.5 mM ; BSP 0.2 mM – 7 injections de 40  $\mu$ l). Seule la composante exothermique est observée en présence du POPG chargé négativement. Les contributions endo-(■) et exo-(●)thermiques sont montrées séparément.

27

2.4 Titration calorimétrique isotherme de vésicules de POPC/Cholestérol (7/3) par des protéines BSP (lipides 5 mM ; BSP 0.2 mM – 7 injections de 40  $\mu$ l)  
A) à 20 °C et B) à 37 °C. Les signaux sont tous B) endothermiques à basse température, et tous C) exothermiques à haute température. Les contributions D) endo-(■) et exo-(●)thermiques sont montrées séparément.

29

- 2.5 A) Isotherme d'association pour des protéines BSP (0.2 mM) se liant à une membrane de 7/3 POPC/Chol (5 mM). La ligne pleine est la simulation théorique des données, à partir de la constante d'affinité obtenue à l'aide du modèle d'association. B) Graphique de type Scatchard pour le même système. La ligne pleine représente la simulation linéaire. 31

### *Chapitre 3*

- 3.1 Évolution de la bande Amide I' des protéines BSP en solution en fonction de la température. 49
- 3.2 Évolution des composantes simulées en fonction de la température pour la protéine BSP en solution. La figure présente les spectres expérimentaux (—), les spectres simulés (— · —) et leurs composantes (····). 50
- 3.3 Évolution des pourcentages respectifs des composantes de la bande Amide I' en fonction de la température. 51
- 3.4 A) Dérivée de l'évolution de la composante à 1661 cm<sup>-1</sup> en fonction de la température, en comparaison avec (B) les résultats obtenus en microcalorimétrie à balayage. 53
- 3.5 Influence de la température (entre 20 et 70 °C, bonds de 5 °C) sur la bande Amide I' des protéines BSP I) seules en solution et II) dans un mélange de ratio molaire égal à 15:1 DMPC/BSP. 54

- 3.6 Évolution des pourcentages respectifs des composantes spectrales simulées de la bande Amide I' des composantes spectrales simulées en fonction de la température, en présence de DMPC. 56
- 3.7 Courbes de thermotropisme de vésicules de DMPC en absence et en présence de protéines BSP. 57
- 3.8 Dérivées des courbes de thermotropisme de DMPC (—) et du mélange 15 :1 DMPC/BSP (- - -). 59
- 3.9 Courbes de thermotropisme A) pour DMPG et B) pour DMPC<sub>D54</sub> dans un mélange DMPC<sub>D54</sub>:DMPG (7:3), à différents rapports lipides/protéine. 60
- 3.10 Dérivée des courbes de thermotropisme des phospholipides à différents rapports lipides/BSP. Les symboles pleins représentent les elongations C-H de DMPG, les symboles vides les elongations C-D de DMPC<sub>D54</sub>. (●○) : Lipides seuls, lipides/BSP : (■□) 50:1 et (▲Δ) : 15:1. 62
- 3.11 Évolution du maximum de la bande Amide I' en fonction de la température. Les domaines A et B ont été définis pour l'analyse 2D. 64
- 3.12 Cartes synchrones (IR à deux dimensions) de la bande Amide I' des protéines BSP A) seules en solution et B) dans un ratio molaire 15:1 DMPC/BSP. La partie gauche montre l'évolution entre 25 et 45 °C, la partie de droite entre 45 et 70 °C. Les spectres au haut et sur le côté de la figure sont les spectres de différences moyens de la série de spectres enregistrés en fonction de la température. Toutes les échelles sont en cm<sup>-1</sup>. 66

## Chapitre 4

- 4.1 Titrages calorimétriques isothermes de suspensions de LDL A) 1 mg/ml et B) 0.1 mg/ml avec une solution de protéines BSP (0.2 mM) à 37°C. 71
- 4.2 Graphique de Scatchard pour le titrage de LDL (0,1 mg/ml) par une solution de protéines BSP (3 mg/ml). Les points représentent les données expérimentales, et le trait la simulation des données. 72



## Liste des symboles et abréviations

- Å : Angstrom ( $1 \times 10^{-10}$  m)
- $A_L$  : aire couverte par un phospholipide
- Arg : arginine
- BSP : bovine seminal plasma (liquide séminal bovin)
- CD : circular dichroism (dichroïsme circulaire)
- $C_f$  : concentration de protéines libres en solution
- chol : cholestérol
- $C_{i,eq}$  : concentration du  $i^{\text{ème}}$  électrolyte en solution
- $C_M$  : concentration en protéines près de la surface de la membrane
- Da : Dalton
- DMPA : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphate (sel de sodium)
- DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
- $DMPC_{D54}$  : 1,2-dimyristoyl-d54-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
- DMPG : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-[phospho-*rac*-(1-glycérol)] (sel de sodium)
- DMPS : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-[phospho-L-sérine] (sel de sodium)
- DSC : differential scanning calorimetry (calorimétrie différentielle à balayage)
- DTGS : détecteur au sulfate de triglycine deutérée
- $e_0$  : charge élémentaire de l'électron
- $F_0$  : constante de Faraday
- FTIR : infrarouge à transformée de Fourier
- IR : infrarouge
- IR-2D : infrarouge à deux dimensions
- ITC : isothermal titration calorimetry (titrage calorimétrique isotherme)
- $K_f^{int}$  : coefficient de partage interfacial
- $K_{int}$  : constante de dissociation intrinsèque
- kJ : kilojoule
- $K_p$  : coefficient de partage

- LDL : low-density lipoproteins (lipoprotéines de faible densité)
- LUV : large unilamellar vesicle (vésicule unilamellaire de grande taille)
- Lys : lysine
- M : concentration molaire volumique (mol/L)
- MLV : multilamellar vesicles (vésicules multilamellaires)
- mol : mole
- MOPS : acide 3-morpholinopropanesulfonique
- $n_L^0$  : nombre de moles de lipides dans la cellule de travail
- nm : nanomètre
- $n_{p,b}$  : nombre de moles de protéines liées à la membrane
- PA : phosphatidic acid (acide phosphatidique)
- PC : phosphocholine
- PE : phosphoéthanolamine
- PG : phosphoglycérol
- PI : point isoélectrique
- 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-phosphoglycérol
- PS : phosphosérine
- R : constante des gaz parfaits
- RMN : résonance magnétique nucléaire
- RPE : résonance paramagnétique électronique
- R-X : rayons X
- SPR : surface plasmon resonance (résonance plasmonique de surface)
- $X_b$  : fraction molaire de protéines liées à la membrane
- $X_{CL}$  : fraction molaire de lipides chargés dans la membrane
- Y : concentration de protéines liées / concentration totale des lipides
- $z_i$  : valence du  $i^{\text{ème}}$  électrolyte
- $z_p$  : charge effective de la protéine
- $\Delta G$  : énergie libre de Gibbs
- $\Delta h, \Delta H$  : variation d'enthalpie
- $\Psi_0$  : potentiel de surface

- $\epsilon_0$  : permittivité du vide
- $\epsilon_R$  : constante diélectrique de l'eau
- $\mu$ l : microlitre
- $\nu_{CH}$  : fréquence des élongations C-H
- o-PC : orthophosphorylcholine
- $\sigma$  : densité de charge interfaciale

## Remerciements

Je voudrais premièrement remercier mon directeur de recherche, Michel Lafleur, pour sa patience et pour avoir cru en moi lors de cette rédaction qui, faut-il le mentionner, s'est échelonnée sur une période plus longue que prévue.

Les travaux présentés dans cet ouvrage ont été rendus possibles grâce à la collaboration de Annick Bergeron, qui a isolé et purifié les protéines BSP, ainsi que les LDL.

Merci également à mon épouse, Marie-Maude, qui n'a jamais perdu sa foi en mes moyens et qui m'a encouragé à terminer ce travail.

Finalement, merci à mes parents qui ont toujours eu une confiance aveugle en mes capacités, et qui me supportent encore à chaque jour.

# Chapitre 1

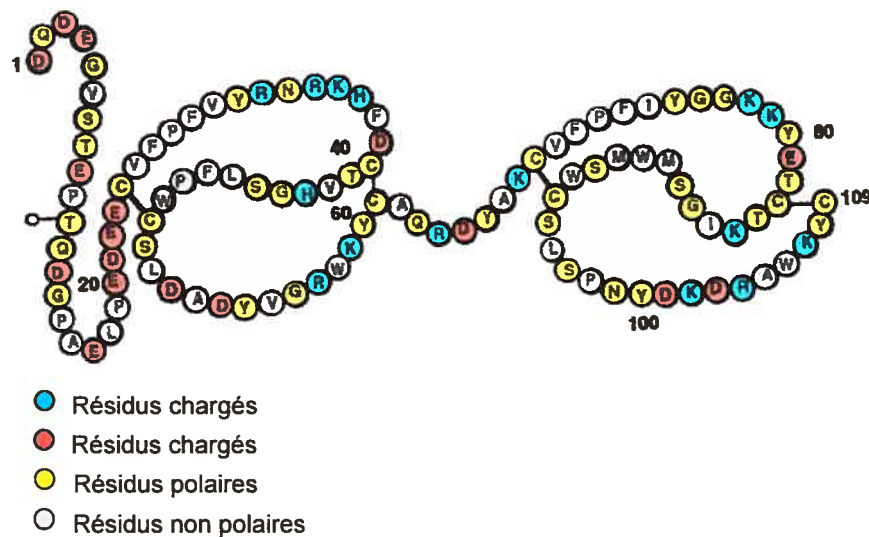
## Introduction

Dans le processus complexe de la reproduction, le liquide séminal bovin, ou plasma séminal bovin, doit jouer un important rôle dans le transport des cellules reproductrices mâles vers l'ovule. Ce liquide contient une grande quantité d'agents chimiques qui façonnent l'évolution des spermatozoïdes vers le but ultime de leur voyage. En dépit de l'importance de ces transformations, les fonctions de ces molécules ne sont pas encore très bien comprises. Une famille de ces molécules, les protéines BSP (Bovine Seminal Plasma), semblent interagir de façon importante avec la membrane des spermatozoïdes. Le but de ce travail est d'investiguer ces interactions. L'association des protéines BSP avec des membranes lipidiques modèles (vésicules) a été étudiée à l'aide de deux techniques. La première, le titrage calorimétrique isotherme (ITC), permet de quantifier en termes d'énergie l'association des protéines aux membranes. La deuxième, la spectroscopie infrarouge à une et deux dimensions, renseigne quant à elle sur la structure de la protéine en solution et lors de son interaction avec des phospholipides.

### 1.1 *Protéines BSP*

Parmi les nombreuses molécules comprises dans le liquide séminal bovin, on retrouve une famille de protéines appelées protéines BSP [1, 2]. Cette famille comprend 4 protéines étroitement reliées : BSP-A1/A2, de masse molaire d'environ 15 000 Da, ne se différencient que par leur degré de glycosylation ; BSP-A3, environ 16 500 Da et finalement, BSP-30kDa, environ 30 000 Da. Les BSP-A1/A2 représentent la majeure partie du mélange (20-25% du total des protéines séminales [1, 3]). Ces protéines sont produites par les vésicules séminales et elles se lient à la membrane des spermatozoïdes lors de l'éjaculation [4]. Les fonctions de ces protéines ne sont pas encore précisément connues. Leur rôle semble se situer au niveau de la régulation de la composition en lipides de la dite membrane. En effet,

elles sont reconnues pour stimuler l'efflux de phospholipides et de cholestérol, par exemple sur des fibroblastes humains et des cellules reproductives bovines [5, 6]. La caractérisation des particules lipidiques résultantes ont montré la présence de phosphocholine et de cholestérol [7]. La modification des quantités relatives de ces deux produits dans la membrane serait à l'origine de la capacitation, évènement durant lequel la membrane du spermatozoïde se déstabilise, permettant ainsi la fécondation de l'ovule [8-10]. Donc, les interactions entre les protéines BSP et les lipides pourraient jouer un rôle important dans la capacitation des spermatozoïdes lors de leur séjour dans l'appareil reproducteur de la femelle. On peut voir la structure primaire de BSP A1/A2 sur la figure 1.1. Il a été montré que cette séquence d'acides aminés est étroitement apparentée à celle du domaine de type II de la fibronectine [3, 11]. La structure de BSP A1/A2 est composée d'une extrémité N-terminale de 23 résidus, suivie de deux domaines de type II de la fibronectine (résidus 24-61, et résidus 69-109); ces deux domaines sont séparés par un pont de sept résidus. Les domaines de type II comprennent chacun deux feuillets  $\beta$  antiparallèles séparés par deux tours irréguliers [12-14]. Ces structures supportent une surface hydrophobe partiellement exposée au solvant [12, 14]. Ces structures semblent être à l'origine des propriétés liantes de la protéine [14]. Chaque protéine contiendrait donc deux sites de d'association distincts [12, 15], qui seraient placés sur la même face de la molécule [16].

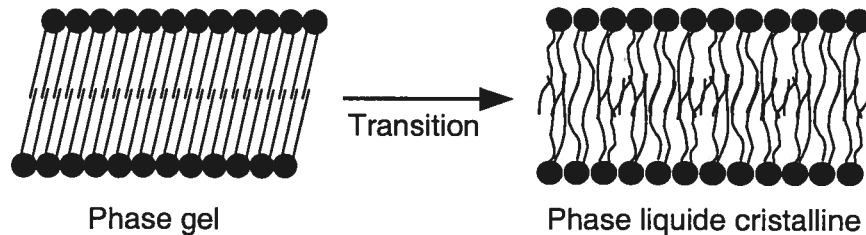


**Figure 1.1 :** Structure primaire de BSP-A1/A2.

## 1.2 Bicouches lipidiques

Les membranes cellulaires, systèmes complexes, sont constituées d'une foule de molécules. Parmi elles, on retrouve les phospholipides, qui constituent la majeure partie de la matrice dans laquelle baignent les protéines membranaires. Ce sont des molécules amphiphiles qui forment généralement des bicouches en milieu aqueux. Dans cette étude, la membrane cellulaire sera mimée par une bicouche de phospholipides synthétiques. Les bicouches lipidiques peuvent adopter plusieurs phases, tout dépendant de la température à laquelle elles se trouvent. Les plus courantes sont la phase gel et la phase liquide cristalline. Dans la phase gel, les chaînes acyles des lipides sont ordonnées, avec une liberté de mouvement très limitée, alors que l'empilement des têtes polaires est compact. Dans la phase liquide cristalline, les chaînes carbonées se désordonnent et les molécules peuvent bouger plus librement. La transition entre ces deux phases, que l'on peut considérer comme une fusion en deux dimensions, se produit à une température spécifique. Ceci est illustré à la figure 1.2. Chez les mammifères, les membranes cellulaires sont

généralement dans la phase liquide cristalline pour permettre les mouvements moléculaires et les échanges chimiques.



**Figure 1.2 :** La transition de la phase gel à la phase liquide cristalline d'une bicouche de phospholipides.

Lors de l'hydratation, les lipides s'assemblent spontanément en vésicules multilamellaires (MLV, multilamellar vesicles). Ces vésicules sont faites de multiples bicouches lipidiques incluses une dans l'autre, que l'on peut imaginer par les couches d'un oignon. Ce type de vésicule a été utilisé dans nos expériences en spectroscopie infrarouge. Pour les expériences en ITC, les MLV ont été extrudées. L'extrusion consiste à faire passer la suspension de vésicules à travers un filtre ayant des pores de taille définie (100 nm dans notre cas). Les vésicules ainsi traitées deviennent unilamellaires (LUV, large unilamellar vesicles) de taille correspondant à peu près à celle des pores du filtre utilisé [17]. Les vésicules unilamellaires se rapprochent davantage des membranes cellulaires car elles ne comportent qu'une bicouche de lipides et sont assez grandes pour présenter une surface considérée comme plane aux molécules qui interagissent avec la membrane. De plus, elles assurent qu'environ la moitié des lipides (ceux des feuillettes externes des LUV) est exposée au milieu extérieur.

### 1.3 Interactions protéines BSP/lipides

Les interactions entre les protéines BSP et les membranes lipidiques sont d'un grand intérêt car elles semblent être au cœur de l'évolution des spermatozoïdes vers la fécondité. Plusieurs techniques ont été utilisées



jusqu'à maintenant pour tenter de les comprendre. La partie choline des phospholipides semble être le site d'interaction de la protéine sur les membranes des spermatozoïdes. Ceci a premièrement été proposé par l'équipe du Dr. Manjunath [18]. Des études en résonance paramagnétique électronique (RPE) [19], des expériences de fluorescence [20] ainsi que des manipulations en résonance plasmonique de surface (SPR) [21] ont par la suite confirmé la préférence des BSP pour les lipides portant la partie choline. Ce type de lipide est présent en bonne quantité dans la membrane plasmique des spermatozoïdes (environ 60% des lipides, sperme de bouc [8]). La partie liante de la protéine qui pourrait reconnaître la choline serait l'arrangement en tandem des deux domaines de type II de la fibronectine nommés précédemment [22]. L'interaction avec la choline semble avoir un effet sur la structure native de la protéine. En effet, des études en spectroscopie infrarouge ont montré une augmentation de la proportion des tours, au dépend d'une diminution de celle des structures désordonnées, lorsque les protéines BSP sont liées à de l'orthophosphorylcholine (o-PC) [23]. Des expériences de chromatographie d'exclusion ont suggéré que les protéines BSP en solution seraient sous forme agrégée et polydisperse, à température de la pièce [23]. Cependant, la complexation avec l'o-PC causerait la dissociation de ces multimères en mono ou dimères. La forme dimère a d'ailleurs également été observée par cristallographie [16, 24]. La structure des protéines BSP semble également être sensible aux variations de température. Des expériences de calorimétrie différentielle à balayage (DSC, differential scanning calorimetry), de même qu'en spectroscopie infrarouge, ont proposé que la protéine libre en solution possède deux transitions induites par une variation de la température. Une première transition a été répertoriée à environ 36°C et serait attribuable à la dissociation des agrégats de BSP mentionnés précédemment. Cet effet de température a également été noté lors d'expériences d'interaction avec l'héparine [25]. Les protéines possèdent également une température de dénaturation autour de 55°C, associée au dépliement coopératif des monomères en solution [23]. L'interaction avec la o-PC a eu pour effet de faire disparaître la première transition, supportant la proposition que les

multimères de protéine en solution se dissocient lors de l'interaction avec la choline. La transition associée à la dénaturation thermique de la protéine a, quant à elle, été déplacée à 76°C, montrant un effet stabilisant de la choline sur la structure des BSP [23, 26].

L'association des protéines BSP à des membranes lipidiques a également été investiguée. Les mêmes effets sur la structure de la protéine ont été observés, en ce qui a trait au comportement en fonction de la température [26]. L'interaction a également un effet sur les lipides de la membrane. Les protéines BSP semblent se lier sur les membranes de PC dans un ratio molaire de 10-12 lipides par protéine [19, 20, 26]. Une étude en RPE a suggéré que les protéines BSP perturbent les lipides en pénétrant dans la partie hydrophobe de la bicouche et en causant une diminution de la mobilité des chaînes acyles, résultant en une baisse de la fluidité de la membrane [19, 20, 27]. Des données en spectroscopie infrarouge vont également dans ce sens, comme le montrent les changements dans les courbes de thermotropisme des chaînes acyles [26]. Toutefois, ces perturbations ne modifient pas la température de transition de phase de vésicules de 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC) [26]. Les études en RPE ont permis de proposer une échelle d'affinité des protéines BSP pour différents lipides contenus dans des membranes de PC, en se basant sur le comportement de lipides avec différentes têtes polaires et portant un groupement nitroxyde sur une chaîne acyle [19]. L'affinité est, dans ce cas, exprimée par l'apparition d'un certain nombre de lipides immobiles sur l'échelle de temps de la RPE. Cette étude place l'affinité pour la PC en premier, suivie de l'acide phosphatidique (PA), du phosphatidylglycérol (PG), de la phosphatidylsérine (PS), de la phosphatidyléthanolamine (PE) et finalement du cholestérol. D'ailleurs, le cholestérol ne montrerait pas d'interaction directe avec les protéines BSP [7, 18, 28]. Toutefois, sa présence dans des membranes de PC semble modifier l'association des protéines BSP. En effet, il provoquerait une augmentation du nombre de phospholipides interagissant avec une protéine [29]. Une autre étude faite à l'aide de la résonance plasmonique de surface suggère un ordre d'affinité

similaire (PC > PG > PA > PE) des protéines pour des monocouches lipidiques [21]. Cet ordre est ici dicté par l'obtention de constantes cinétiques d'association et de dissociation. Toutefois, il est important de mentionner que toutes les membranes utilisées dans la dernière étude mentionnée contenaient 20 (poids/poids)% de cholestérol. En absence de cholestérol, la SPR indique un efflux de lipides provenant de membranes de PC, en accord avec les autres études mentionnées précédemment.

L'effet d'une charge négative sur l'association est également répertoriée dans la littérature [20]. Cette étude par RPE propose que l'affinité de protéines BSP pour les membranes de PC est réduite lorsque PS y est insérée. Dans le même sens, l'étude par résonance plasmonique de surface (SPR) [21] montrant une affinité particulière des protéines BSP pour la PC, propose un affaiblissement de l'interaction lorsque les protéines BSP interagissent avec des membranes de PC-cholestérol contenant une charge négative (PG, PA). Cette étude mentionne également que la présence du lipide zwitterionique PE produit le même effet.

#### 1.4 LDL (*Low-density lipoproteins*) du jaune d'oeuf

Le jaune d'oeuf est depuis longtemps utilisé dans la conservation des semences bovines [30]. En effet, le jaune d'oeuf permet non seulement de prolonger la survie de ces semences, il les protège également contre les conditions cryogéniques. Cependant, les mécanismes qui expliquent la qualité de cette préservation ne sont pas compris. Le jaune d'oeuf contient des lipoprotéines appelées LDL (*low-density lipoproteins*) qui pourraient jouer un rôle dans cette conservation. Les LDL contiennent environ 89% de lipides, dont environ 27% sont des phospholipides, 69% des triglycérides et 4% du cholestérol [31, 32]. La partie phospholipidique est composée d'environ 9% de sphingomyéline, 76% de (phosphocholine + phosphoinositol) et 16% de phosphatidyléthanolamine (PE). Deux mécanismes d'action sont présentement proposés pour expliquer les propriétés de conservation des LDL [30]. Le premier propose une interaction entre les LDL et la membrane plasmique des spermatozoïdes, protégeant ces derniers contre les effets de

la température et contre les agents chimiques qui accélèrent la maturation des cellules reproductrices, incluant les protéines BSP. Le deuxième fait plutôt état d'une interaction entre la famille de protéines BSP, contenues dans le liquide séminal, et les LDL [30]. Une interaction entre les protéines BSP et LDL pourrait inhiber l'adsorption des protéines BSP sur les membranes plasmiques, éliminant l'association de ces protéines aux spermatozoïdes et la maturation qu'elles entraînent. Ce déplacement permettrait ainsi une préservation des semences. De plus, puisque les LDL contiennent de la choline, il est possible que les protéines BSP aient une certaine affinité pour ces lipoprotéines. Avec l'aide de la technique ITC, nous avons tenté d'examiner les interactions LDL-phospholipides et celles BSP-LDL, en espérant identifier lequel de ces deux mécanismes est le plus probable.

## 1.5 Titrage calorimétrique isotherme (ITC)

### 1.5.1 La technique

Le titrage calorimétrique isotherme (ITC) est une technique relativement nouvelle en ce qui a trait à l'étude des interactions entre différentes molécules. Entre autres, cette technique a été appliquée à l'association de peptides [35-40] et de surfactants [41-46] à des membranes. Cette technique permet de mesurer *in situ* l'enthalpie de réaction entre les deux réactifs. Le calorimètre comprend une cellule de référence (contenant de l'eau) et une cellule de travail qui contient un des réactifs en solution; ces deux cellules ont chacune un volume d'environ 1,5 ml. L'autre réactif est injecté au moyen d'une seringue dont l'aiguille est insérée dans la cellule de travail. Cette seringue injecte des volumes précis (typiquement 5 à 40  $\mu$ l) d'une solution du deuxième réactif, à des intervalles de temps précis (déterminés par l'utilisateur). Lorsque les deux réactifs réagissent, il s'ensuit une absorption (réaction endothermique) ou un dégagement (réaction exothermique) d'énergie. Cette variation d'enthalpie induit un changement de l'énergie nécessaire pour maintenir la cellule expérimentale à la même température

que la cellule de référence. Cette quantité d'énergie est enregistrée par le calorimètre, puis ensuite convertie en joules/mol par le logiciel d'acquisition. On fait plusieurs injections successives pour en arriver, idéalement, à un titrage complet des molécules dans la cellule de travail. Il est à noter que cet appareil est très sensible, pouvant détecter des variations de température jusqu'à  $1 \times 10^{-6}$  °C. Cette sensibilité permet d'utiliser des échantillons en faible concentration ( $\sim 10^{-3}$  M) et l'ajout de volumes restreints.

Dans cette étude, les vésicules extrudées sont placées dans la cellule et les protéines BSP y sont injectées. L'enthalpie lors de l'adsorption des protéines sur les vésicules est mesurée. Chaque injection donne une enthalpie  $\Delta h_i$ . Cette valeur est associée à l'enthalpie molaire d'association et à la quantité de protéine qui se lie. L'enthalpie molaire de réaction ( $\Delta H_{\text{mol}}$ ) peut être obtenue lorsqu'on injecte une petite quantité de protéines à un grand excès de lipides, ce qui assure une association complète des protéines injectées. En mesurant ces paramètres, il est possible d'établir après chacune des injections, la quantité de protéine liée et celle qui demeure libre en solution, de la façon suivante.  $X_b$ , le rapport molaire de protéines qui est liée à la membrane (l'indice b est pour « bound »), se décrit comme suit :

$$X_b = \frac{n_{P,b}}{n_{P,b} + n_L^0} \quad \text{équation 1.1}$$

où  $n_{P,b}$  est le nombre de moles de protéines liées à la membrane et  $n_L^0$  le nombre de moles de lipides dans la cellule de travail. Il est possible que les protéines ne puissent pas traverser la membrane lipidique. Dans ce cas, il faut supposer que seulement la moitié des lipides est accessible aux protéines puisque l'autre moitié est dans le feuillet interne. On estime alors que  $X_b$  devient  $X_b^*$ , où  $X_b^* = X_b/0,5$ . La valeur de  $n_{P,b}$  peut être obtenue des données expérimentales avec :

$$n_{P,b} = \frac{\sum \Delta h_i}{\Delta H_{\text{mol}}} \quad \text{équation 1.2}$$

où  $\Delta h_i$  est l'enthalpie mesurée à chaque injection,  $\Delta H_{\text{mol}}$  l'enthalpie molaire d'association et  $n_{p,b}$  est le nombre de mole de protéine liée à chaque injection. Donc, en connaissant la quantité de protéine qui est liée à la membrane en tout temps pendant l'expérience, on peut calculer la concentration de protéine libres en solution ( $C_f$ , l'indice f est pour « free »). Ces résultats mènent à des isothermes d'association qui peuvent être analysés à l'aide de certains modèles.

### 1.5.2 Modèles pour analyser les interactions BSP-membranes

#### 1.5.2.1 Coefficient de partage

Un des modèles qui peut être appliqué à l'analyse des interactions entre les protéines et des membranes lipidiques modèles est basé sur le coefficient de partage ( $K_p$ ) de la protéine entre la phase aqueuse et la phase lipidique, la membrane étant traitée comme une pseudo-phase. Ce modèle a été développé dans les années 90 par Joachim Seelig et collaborateurs [35, 41]. Ce coefficient de partage est dérivé d'un isotherme d'association défini par 2 termes :  $X_b$  et  $C_f$  ( $C_f$  est la concentration de protéines libre en solution, l'indice f étant pour « free »). À partir de ces données, l'isotherme peut être tracé. Si l'interaction se réduit à une simple partition d'une particule avec la membrane (sans interactions électrostatiques entre les molécules, par exemple), un graphique de  $X_b^*$  en fonction de  $C_f$  devrait donner une relation linéaire avec une pente de  $K_p$ . Cet équilibre est décrit par :

$$K_p = \frac{X_b^*}{C_f} \quad \text{équation 1.3}$$

Une relation non linéaire implique que d'autres interactions doivent être prises en compte. On peut tenir compte des interactions électrostatiques entre la surface chargée de la membrane et les protéines en solution. Si la surface de la membrane et la protéine sont chargées, il se crée un gradient

de concentration en protéine, de la surface au coeur de phase. Dans ce cas, la constante de partage peut être exprimée à partir de la concentration de la protéine près de l'interface ( $C_M$ ), une concentration qui peut être considérablement différente de celle en coeur de phase. Ce gradient peut être, en première approximation, décrit par la théorie de Gouy-Chapman [47]. Certaines hypothèses sont reliées à cette théorie. Premièrement, la densité de charge de la surface de la membrane est considérée uniforme. Ensuite, la surface est plane, et les charges en solution sont considérées ponctuelles. Nos systèmes sont constitués de lipides qui ne sont pas nécessairement alignés parfaitement dans la bicouche, ce qui ne correspond pas à une surface plane parfaite. De plus, les protéines ne sont sûrement pas des charges ponctuelles dans l'espace. Malgré ces hypothèses qui ne sont que grossièrement respectées, le succès du modèle sur des systèmes similaires nous encourage à l'appliquer pour l'analyse de nos données. Dans cette théorie, la densité de charge interfaciale ( $\sigma$ ) est donnée par :

$$\sigma = \left( \frac{e_0}{A_L} \right) (-X_{CL} + X_b^* z_p) \quad \text{équation 1.4}$$

où  $e_0$  est la charge élémentaire de l'électron,  $A_L$  est l'aire couverte par un phospholipide (considérée dans notre cas comme identique pour tous les lipides utilisés et égale à  $68 \text{ \AA}^2$  [48, 49]),  $X_{CL}$  est la fraction molaire de lipides chargés dans la membrane (s'il y a lieu) et  $z_p$  est la charge effective de la protéine. Il est important de mentionner que la charge effective fournie par le modèle n'est pas nécessairement équivalente à la charge nette de la protéine en solution. Il a été montré avec d'autres systèmes que la charge effective est généralement inférieure à la charge réelle [48, 49]. Elle représente plutôt la charge impliquée dans les interactions électrostatiques associées à la création du gradient de concentration en protéine dans la solution. L'approche ne tient également pas compte de la contribution de la protéine à la surface de la membrane. Il n'existe pas de donnée sur la pénétration de la protéine dans la membrane; nous avons donc considéré l'hypothèse la plus simple qui est l'adsorption de la protéine sur une surface, sans aucune insertion (i.e. la contribution de la protéine à l'aire est 0). La

connaissance de la densité de charge de surface permet le calcul du potentiel de surface  $\Psi_0$  à l'aide de l'équation 1.5 :

$$\sigma^2 = 2000 \varepsilon_0 \varepsilon_R RT \sum_i C_{i,eq} (e^{-z_i F_0 \Psi_0 / RT} - 1) \quad \text{équation 1.5}$$

dans laquelle  $\varepsilon_0$  est la permittivité du vide,  $\varepsilon_R = 78$  est la constante diélectrique de l'eau,  $R$  est la constante des gaz parfaits,  $F_0$  la constante de Faraday,  $C_{i,eq}$  est la concentration du  $i$ ème électrolyte en solution et  $z_i$  la valence du  $i$ ème électrolyte.

L'équation 1.6 permet ensuite de calculer la concentration de protéines directement à l'interface de la membrane ( $C_M$ ) avec :

$$C_M = C_f \exp \left[ -\frac{z_p F_0 \Psi_0}{RT} \right] \quad \text{équation 1.6}$$

On reproduit donc les données expérimentales en ajustant  $Z_p$  et le coefficient de partage ( $K_f^{int}$ ) entre les protéines libres à l'interface de la membrane et celles qui s'incorporent dans la membrane.

$$K_f^{int} = \frac{X_b^*}{C_M} \quad \text{équation 1.7}$$

De cette façon, les interactions à longue portée (électrostatiques) sont séparées des interactions à courte portée (partage dans la membrane). Ainsi, la variation de la densité de charges à la surface de la membrane est responsable, dans ce modèle, de la courbure de l'isotherme. Cette approche a déjà été utilisée pour décrire les interactions entre des peptides et des membranes lipidiques, comme l'adsorption de la méllitine, un peptide du venin d'abeille [48], et de peptides amphiphiles synthétiques [49] sur des membranes de POPC/POPG. Les techniques utilisées pour construire les isothermes d'association dans ces exemples sont respectivement l'évolution du spectre de dichroïsme circulaire [48] et le déplacement du maximum de fluorescence des résidus tryptophane [49]. L'utilisation de cette théorie a



également été fructueuse pour les études en ITC d'interactions d'autres peptides tels l'ocrotide (un analogue de la somatostatine) [35, 39], la nisine Z [36] et la magainin 2 [38] à des membranes lipidiques.

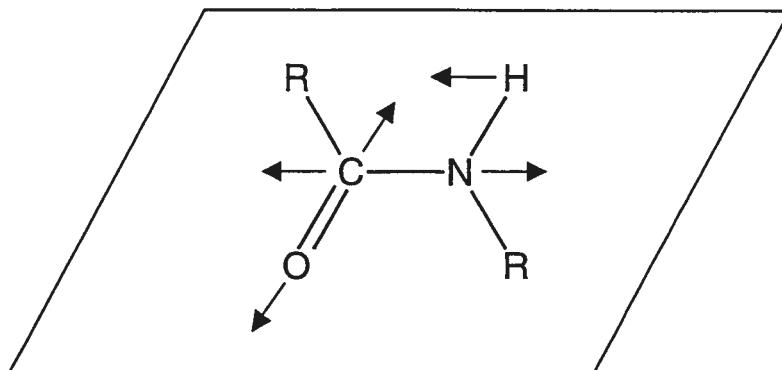
#### 1.5.2.2 *Modèle d'affinité selon Scatchard*

L'affinité d'une protéine pour une membrane peut être définie par un modèle de type Scatchard. Cette approche a déjà été utilisée pour analyser des données obtenues par résonance plasmonique de surface (SPR) pour ce système [21]. Dans ce cas, il est assumé qu'une vésicule de lipides fournit  $m$  sites d'association indépendants et équivalents aux protéines, et que ces sites sont caractérisés par une constante de dissociation intrinsèque,  $K_{int}$ .  $Y$  est un ratio défini comme étant la concentration de protéines BSP liées, divisée par la concentration des lipides dans la cellule expérimentale, et  $C_f$  est la concentration des protéines BSP libres en solution. Le modèle prédit une relation linéaire entre  $Y$  et le terme  $Y/C_f$ . De cette relation linéaire, on peut extraire la constante de dissociation intrinsèque,  $K_{int}$ , et le nombre de sites d'association de la protéine BSP,  $m$ . Les valeurs de  $m$  sont exprimées en termes de lipides par site,  $n$  (donc  $n=1/m$ ).

### 1.6 *Spectroscopie infrarouge*

#### 1.6.1 *Région Amide I*

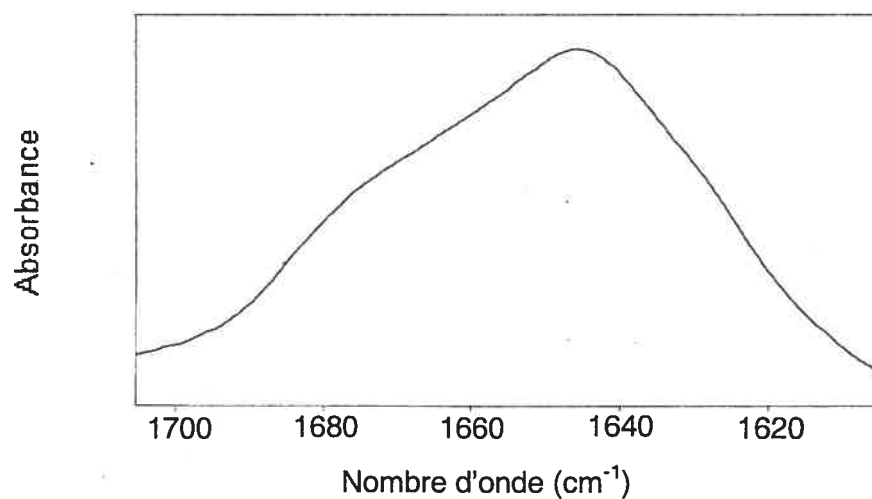
La spectroscopie infrarouge est une technique de choix pour suivre l'évolution de la structure d'une protéine soumise à une perturbation, une variation de la température dans notre étude. La région spectrale d'intérêt pour l'analyse des protéines est la bande Amide I (ou Amide I' lorsque le groupement amide est deutéré), qui est située entre  $1600$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$  [50]. Le choix de cette bande est justifié par le fait qu'elle est très sensible à la structure secondaire des protéines. Le mode de vibration Amide I comprend principalement l'élongation  $C=O$  du groupement amide, couplée à la déformation dans le plan des  $C-N-H$  et à l'élongation  $C-N$  (figure 1.3).



**Figure 1.3 :** Mode de vibration de la bande Amide I

Les éléments de structure secondaire des protéines tels que les hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et structures désordonnées, donnent lieu à des composantes Amide I' avec des fréquences caractéristiques. Dans un tampon deutéré, la composante Amide I' associée aux hélices  $\alpha$  est comprise entre 1650 et 1658  $\text{cm}^{-1}$ ; celle des feuillets  $\beta$  entre 1620 et 1640  $\text{cm}^{-1}$ ; les structures désordonnées se retrouvent vers 1644  $\text{cm}^{-1}$  [50].

Dans les spectres de protéines, la bande Amide I se présente souvent sous la forme d'une bande très large entre 1600 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  où plusieurs composantes non résolues coexistent (voir exemple figure 1.4).



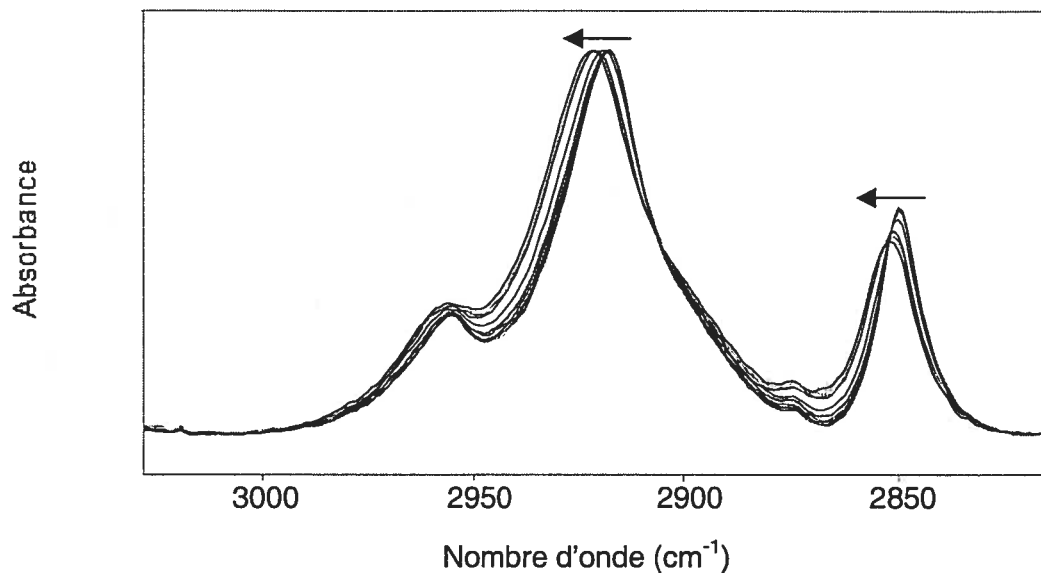
**Figure 1.4 :** Région Amide I' du spectre de la protéine BSP en solution. La bande est large et non résolue

Ceci rend difficile l'attribution et la quantification des différents éléments de structure secondaire. Une façon de remédier à ce problème est de recourir à la simulation mathématique des différentes composantes de la bande étudiée. Pour y arriver, il faut d'abord identifier le nombre de composantes possible de la bande et d'en estimer les positions. Pour ce faire, le calcul de la dérivée seconde du spectre de la bande peut aider à détecter les différentes composantes non résolues. Le nombre de composantes est un paramètre donné par l'opérateur. Leurs positions respectives sont utilisées comme paramètres initiaux dans un programme de simulation de bandes. Ce programme est un processus itératif qui calcule les solutions possibles pour simuler le spectre expérimental à partir d'un certain nombre de bandes, jusqu'à l'obtention de la meilleure solution possible (identifiée par celle qui possède le plus bas  $\chi^2$ ). Il est possible de guider le calcul en introduisant des restrictions sur la position des composantes, sur leur largeur, leur hauteur (absorbance), etc. Ces limites sont utilisées pour diriger l'algorithme vers des solutions mathématiques avec une signification physique et pour améliorer la reproductibilité des résultats. En procédant de cette façon et en respectant la méthode établie, il est possible d'obtenir des résultats reproductibles qui reflètent le plus fidèlement possible la structure de la protéine. Cette technique est maintenant bien connue et est très bien expliquée dans la littérature [50-52]. De cette façon, il devient possible de calculer le pourcentage de chaque élément de structure et ainsi en déduire des informations structurales sur la protéine étudiée. Il faut cependant noter que les pourcentages attribués repose sur l'hypothèse que tous les éléments de structure secondaires possèdent le même coefficient d'absorptivité molaire ( $\epsilon$ ) [50, 52].

### 1.6.2 *Élongation $\nu_{CH}$ des phospholipides*

La région des élongations  $\nu_{CH}$  des phospholipides est sensible à la transition de phase de ces derniers [53, 54]. Lorsqu'une bicouche passe de la phase gel à la phase liquide cristalline, la fréquence des bandes associées aux

élongations C-H ( $2850\text{ cm}^{-1}$  (symétrique) et  $2920\text{ cm}^{-1}$  (antisymétrique)) augmente. Cette augmentation est causée par l'isomérisation trans-gauche et par la perte du couplage inter-chaînes [53, 54, 56]. Un exemple de ce changement de fréquences est montré à la figure 1.5.



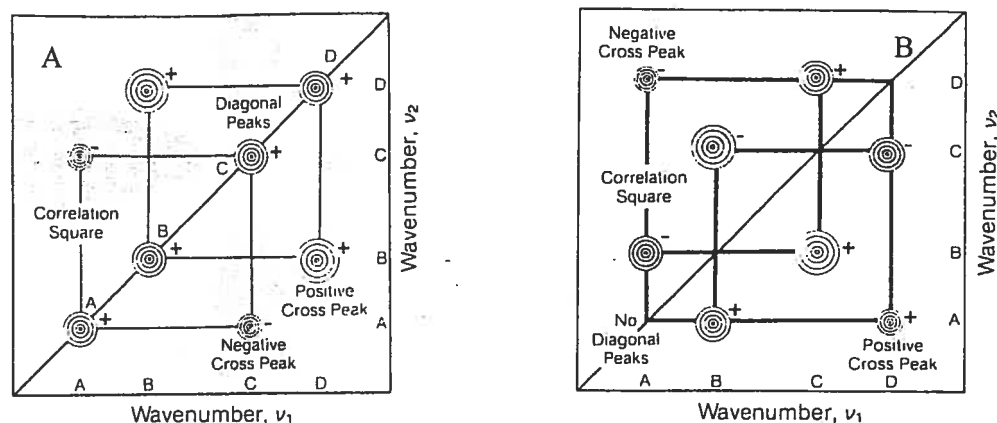
**Figure 1.5 :** Augmentation de la fréquence des bandes associées aux élongations C-H des chaînes acyles de la DMPC lors de son passage de la phase gel à la phase liquide cristalline ( $T = 23^{\circ}\text{C}$ ). Les flèches indiquent le déplacement des bandes lors du chauffage.

En suivant l'évolution de la fréquence en fonction de la température, il est possible d'investiguer l'effet de l'association d'une protéine membranaire sur le thermotropisme d'une bicouche lipidique. Ce type d'expérience est fréquemment utilisé [53-55]. Il est donc possible de vérifier si l'association de la protéine à la membrane perturbe les chaînes acyles des lipides. Il est même possible d'étudier des systèmes ternaires (deux lipides différents et une protéine) avec cette technique [54]. Il suffit qu'un des deux lipides ait des chaînes acyles deutérées. Les élongations C-D ont une fréquence plus basse que les élongations C-H; il est donc possible de suivre séparément et simultanément l'évolution des deux lipides qui constituent la membrane. Les élongations C-D sont elles aussi sensibles à l'ordre conformationnel des

chaînes acyles. En conséquence, elles peuvent servir de sondes pour détecter les transitions dans les lipides aux chaînes deutérées [53, 56].

### 1.6.3 Spectroscopie infrarouge à deux dimensions

La spectroscopie infrarouge à deux dimensions est une technique relativement nouvelle introduite à la fin des années 80 par Isao Noda [57]. Cette technique permet de générer des spectres infrarouges en deux dimensions, avec deux échelles de nombre d'onde indépendantes. Pour y arriver, l'échantillon analysé doit être soumis à une perturbation extérieure pour ainsi créer une série de spectres dynamiques. Sous l'influence de cette perturbation, les composantes spectrales varient ; ce sont ces variations qui donnent naissance à la deuxième dimension spectrale. La théorie derrière ce processus est bien expliquée dans la littérature [57, 58]. Deux cartes sont générées par le traitement mathématique appliqué à la série de spectres (figure 1.6). Dans la première carte dite synchrone, deux types de signaux peuvent être observés. Ceux qui sont sur la diagonale correspondent aux fluctuations dynamiques des signaux IR soumis à la perturbation externe. En d'autres mots, ils montrent quelle(s) partie(s) du spectre change(nt) lors de la perturbation. Les signaux qui sont situés en dehors de la diagonale sont appelés pics croisés. Ils apparaissent lorsque les variations dynamiques du spectre IR à deux fréquences différentes sont en phase. Donc, si deux bandes ou deux composantes d'une bande répondent en même temps sous l'effet de la perturbation externe, elles montrent une corrélation (pics croisés) sur la carte synchrone. Si la variation se fait dans le même sens, le pic croisé résultant est positif; si la variation se fait en sens contraires, le pic croisé est négatif. La deuxième carte générée est la carte asynchrone. Celle-ci est complémentaire à la première. Elle montre les corrélations qui ne sont pas en phase, donc entre des bandes qui varient, mais pas simultanément. Elle ne présente donc jamais de signaux sur la diagonale. Elle peut également renseigner sur l'ordre des événements spectraux, comme par exemple établir si une bande change avant une autre.



**Figure 1.6 :** A) Schéma d'une carte IR-2D synchrone. Les régions ombragées représentent les régions d'intensité négative. Les fluctuations dynamiques sont sur la diagonale, alors que les pics croisés sont hors diagonale. B) Schéma d'une carte IR-2D asynchrone. Ce type de carte ne peut contenir que des pics croisés [58].

Cette technique a d'abord été élaborée dans le cadre d'études spectroscopiques de mélanges de polymères [58], mais elle s'applique à n'importe quel système qui montre une évolution spectrale sous l'effet d'une perturbation extérieure (temps, température, contrainte physique, etc.). Elle a été appliquée avec succès à des études de structure secondaire de protéines [59] et d'interactions lipide-protéine [60]. Elle pourra donc être appliquée dans ce travail à l'étude des interactions entre les protéines BSP et les membranes lipidiques.

### 1.7 Problématique

Le but du présent travail est l'étude des interactions entre les protéines BSP et les membranes lipidiques. L'utilisation du titrage calorimétrique isotherme conduit à des informations thermodynamiques pertinentes, entre autres en ce qui concerne l'enthalpie molaire d'association. De plus, cette technique permet le calcul de coefficients de partition. Ceci peut nous permettre de vérifier si les protéines BSP ont une affinité particulière avec les lipides

contenant de la choline. Nous avons également étendu ce volet de l'étude à l'association avec des membranes de différentes compositions lipidiques, pour établir les différentes affinités pour les différents systèmes étudiés. Puisque les protéines BSP possèdent un comportement thermotropique complexe, il est intéressant d'examiner si les variations de température affectent les interactions entre ces protéines et des membranes lipidiques.

Il a été proposé que la présence d'une charge négative ou de cholestérol dans la membrane modifie l'association des protéines BSP [20, 28, 29]. Ces effets sont investigués à l'aide du titrage calorimétrique isotherme afin de montrer dans quelle mesure la thermodynamique d'association est affectée par la modification de la composition lipidique de la membrane. Une étude complémentaire en spectroscopie infrarouge à une et deux dimensions est menée pour tenter d'obtenir des informations additionnelles sur le thermotropisme des protéines BSP. De plus, cette étude permet également de suivre l'évolution des différentes composantes de la structure secondaire de ces protéines en fonction de la température. Finalement, cette technique fournit aussi des renseignements sur les changements structuraux subis par la protéine et les lipides lors de l'association des protéines BSP à des membranes lipidiques. Pendant ces expériences, nous avons montré que les interactions entre les protéines BSP et les membranes lipidiques dépendent de la température de façon importante, ce qui n'avait jamais été montré jusqu'à maintenant.

## Chapitre 2

# Spécificité lipidique et effet de la température lors de l'association des protéines BSP à des membranes modèles

### 2.1 Introduction

Dans ce chapitre, les interactions entre les protéines BSP et quatre membranes modèles ont été investiguées à l'aide de la technique du titrage calorimétrique isotherme et de la spectroscopie infrarouge à une et deux dimensions. Les résultats ont été analysés à l'aide de deux modèles théoriques.

### 2.2 Matériel et méthodes

#### 2.2.1 Produits chimiques

Les protéines BSP ont été isolées et purifiées par l'équipe du docteur Manjunath, selon une procédure déjà décrite dans la littérature [1, 2]. Les lipides utilisés, soient la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC), le 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol (POPG), et la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE), ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) et utilisés sans autre purification. Le tampon MOPS (acide 3-morpholinopropanesulfonique) et le cholestérol proviennent de chez Sigma (St-Louis, MO).

#### 2.2.2 Titrage calorimétrique isotherme (ITC)

Pour préparer les mélanges lipidiques, des quantités appropriées de chacun des lipides ont été dissoutes dans un mélange 95:5 (volume/volume) benzène/méthanol. Ces solutions ont été mélangées, puis lyophilisées. La poudre lipidique résultante a été hydratée dans un tampon MOPS (10 mM,



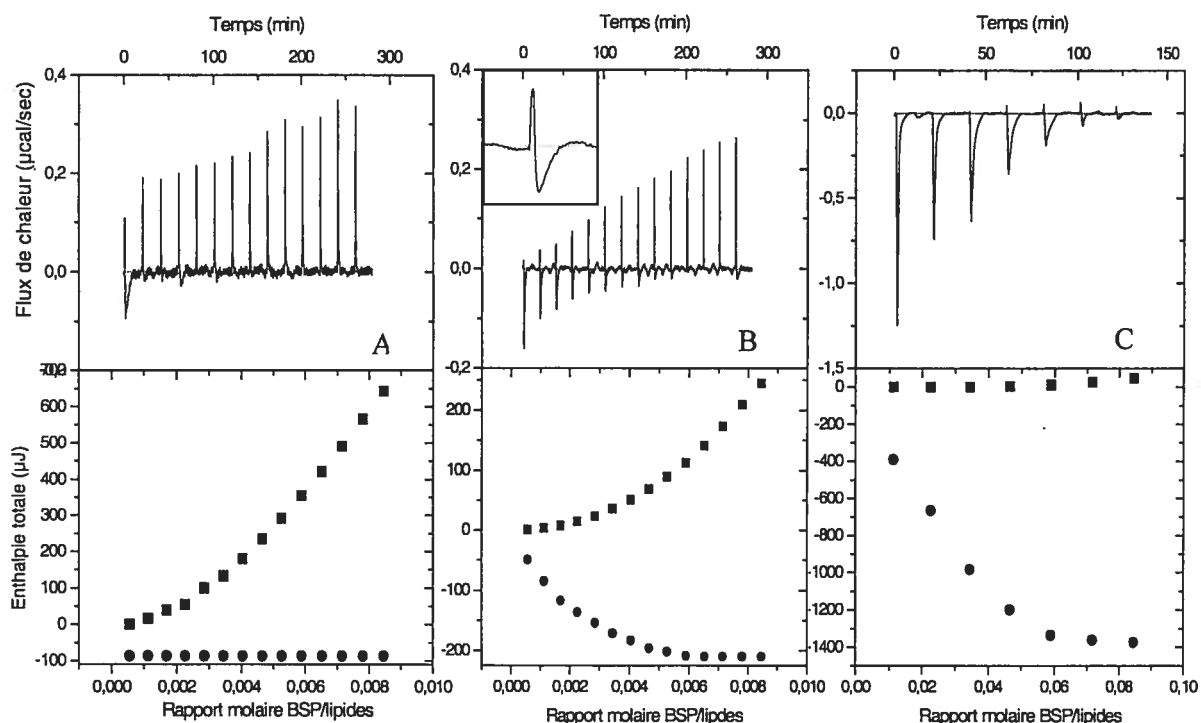
pH 7.4) et soumise à 5 cycles de gel/dégel (de l'azote liquide (-196°C) à ~35 °C). Les vésicules unilamellaires (LUV) ont été préparées en extrudant les suspensions lipidiques 10 fois au travers de 2 filtres de polycarbonate superposés, ayant des pores de 100 nm de diamètre. Cette manipulation s'est faite à l'aide d'un extrudeur commercial (Avestin, Ottawa, ON). La concentration exacte des phospholipides a été déterminée avec la méthode de détection de phosphore Fiske-SubbaRow [61]. Les protéines BSP ont été dissoutes dans le même tampon. Le pH de la solution de protéine a été mesuré et réajusté si nécessaire.

Les expériences de titrage calorimétrique isotherme (ITC) ont été menées sur un calorimètre MicroCal VP-ITC (MicroCal inc., Northampton, MA). De façon typique, la cellule du calorimètre a été remplie de suspension de vésicules (LUV) (3-5 mM) et une solution de BSP (0.2 mM) était chargée dans la seringue d'injection de l'appareil. Le volume de la cellule expérimentale est de 1.4527 ml. La solution de protéines BSP a été injectée dans la cellule expérimentale (habituellement 7 injections de 40 µl chacune) sous une agitation constante du mélange (rotation de la seringue de 300 tours/minute). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Origin™ (version 5.0), fourni par MicroCal. Les valeurs présentées, ainsi que l'erreur sur ces valeurs, proviennent généralement d'expérimentations en duplicata.

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Titration calorimétrique isotherme (ITC)

Les expériences de titrage calorimétrique isotherme des vésicules de POPC avec les protéines BSP ont été menées à 10, 20 et 37°C. Ces résultats sont montrés à la figure 2.1.



**Figure 2.1** : Titration calorimétrique isotherme de vésicules de POPC par des protéines BSP à A) 10 °C (POPC 5 mM; BSP 0.2 mM - 14 injections de 20 µL), B) 20 °C (POPC 5 mM; BSP 0.2 mM - 14 injections de 20 µL), et C) 37 °C (POPC 0.5 mM; BSP 0.2 mM - 7 injections de 40 µL). La partie du haut de la figure montre le thermogramme représentant les changements dans le flux de chaleur qui résultent des injections. La partie du bas montre l'enthalpie totale d'association calculée. Les contributions endo- (■) et exo-(●)thermiques sont montrées séparément.

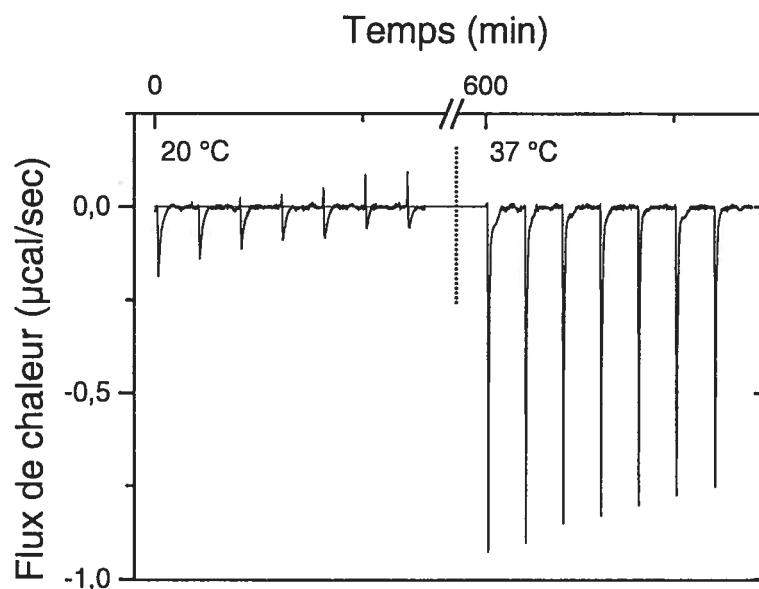
À 37°C, le titrage montre que les pics sont uniquement exothermiques, et que l'aire de ces pics diminue progressivement pendant le titrage. Des expériences de contrôle ont montré que la dilution des vésicules lors de l'ajout de tampon, et que l'injection de protéines BSP dans le tampon seul ne représentent pas une contribution significative au signal mesuré. Ainsi, les pics enregistrés sont associés à l'interaction des protéines BSP avec les vésicules lipidiques. La décroissance progressive de l'aire des pics montre que la membrane lipidique se sature de protéines BSP lors du titrage. Un titrage similaire a été effectué avec une plus grande concentration en lipides dans la cellule expérimentale : 20 à 40  $\mu\text{l}$  de solution de protéines BSP (0.2 mM) ont été injectés sur une suspension concentrée de vésicules de POPC (5 mM) (non illustré). Dans ces conditions, le pic exothermique correspondant à la première injection est associé à l'association pratiquement complète des protéines BSP injectées sur les lipides. Ces pics ont fourni les données pour calculer l'enthalpie molaire d'association ( $\Delta H_{\text{mol}}$ ), reliée à l'association des protéines BSP à des vésicules de POPC (c.a.d. au transfert de la protéine, de la solution aqueuse à l'environnement des vésicules lipidiques). Le  $\Delta H_{\text{mol}}$  de l'association de BSP à POPC est  $-65 \pm 2$  kJ/mol (données présentées dans le tableau I). La partie du bas des thermogrammes de la figure 2.1 montre l'enthalpie totale d'association mesurée pendant le titrage,  $\sum_i \Delta h_i$ , où  $\Delta h_i$  est l'enthalpie associée à la  $i^{\text{ème}}$  injection. L'enthalpie totale atteint un maximum d'environ  $-1\ 400$   $\mu\text{J}$  après 5 injections, alors que le ratio molaire BSP/lipides dans la cellule est de 0.06. En utilisant la valeur de  $\Delta H_{\text{mol}}$ , on peut trouver qu'à la fin du titrage, le ratio lipide/BSP associée est de  $30 \pm 2$  (données également présentées dans le tableau I).

Système	Saturation de la membrane (Lipides/BSP)	$\Delta H_{\text{mol}}$ (kJ/mol BSP)
POPC	30 ± 2	-65 ± 2
POPC/POPG	24 ± 2	-124 ± 9
POPC/POPE	54 ± 4	-57 ± 3
POPC/Chol	254 ± 20	-61 ± 10

**Tableau I :** Saturation de la membrane (lipides/BSP) et enthalpie molaire d'association pour 4 systèmes lipidiques étudiés, à 37°C. Le ratio de saturation est calculé en tenant compte des lipides des 2 côtés de la bicouche des vésicules. Les ratios de saturation proviennent de données en duplicata, et les  $\Delta H_{\text{mol}}$  de données en duplicata.

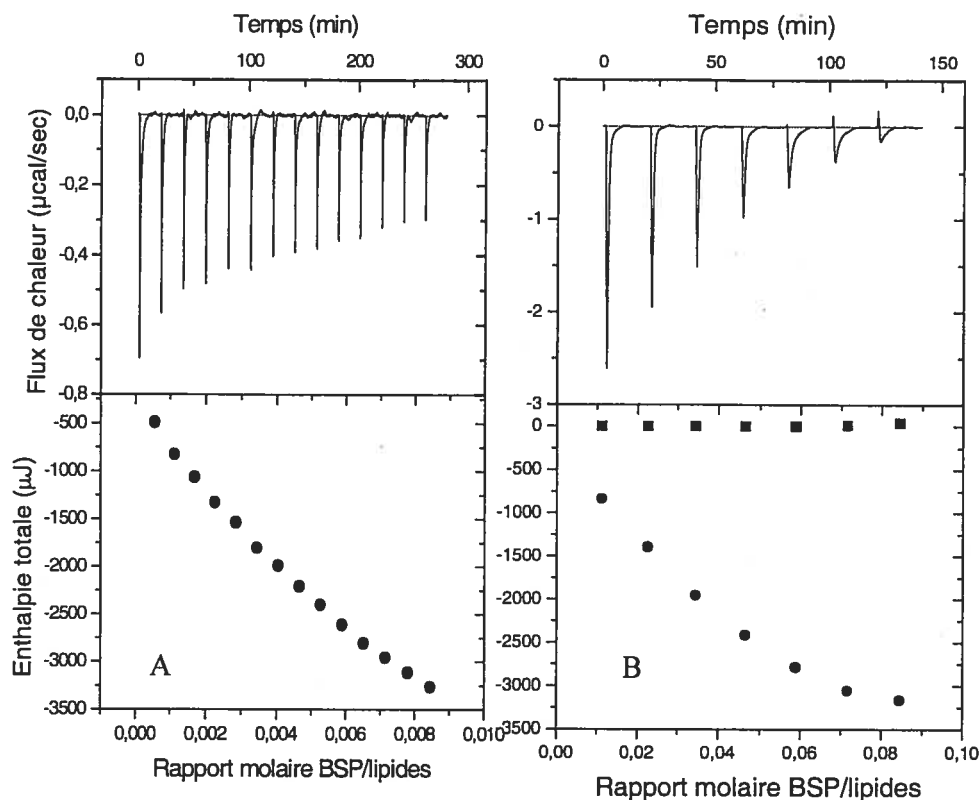
À 20 °C, deux phénomènes différents sont observés jusqu'à la 9<sup>e</sup> injection (figure 2.1 B). Au début du titrage, un signal exothermique est prédominant. Il est accompagné d'une étroite contribution endothermique. La composante exothermique décroît jusqu'à la ligne de base pendant le titrage, alors que la contribution endothermique augmente de façon significative. L'insertion (encadrée) dans la figure 2.1 B montre un agrandissement d'un pic fait à l'aide du logiciel de traitement de données. On y voit que la détection du signal endothermique semble se faire avant celle du signal exothermique. Cette observation pourrait indiquer que les événements reliés à ces deux signaux différents ne se produisent pas selon la même cinétique. La partie du bas du thermogramme montre toujours l'enthalpie totale d'association mesurée pendant le titrage. Les deux composantes, qui se produisent lors de la même injection, ont été intégrées séparément en définissant manuellement les limites d'intégration. L'énergie impliquée dans les pics exothermiques est considérablement plus faible que celle mesurée à 37 °C, par un facteur 7 environ. Il doit être noté que la concentration des lipides à 20 °C est 10 fois plus grande que celle à 37 °C ; ceci est nécessaire pour

assurer l'obtention d'un signal d'une intensité et d'une reproductibilité acceptables. De plus, ces conditions étaient requises pour observer une saturation de la membranes par les protéines BSP, du point de vue des signaux exothermiques. Les différences observées entre les deux profils de titrage suggèrent un effet de la température sur l'association des protéines BSP aux vésicules de POPC. Pour investiguer cet effet de façon plus approfondie, des titrages ont été effectués à 10 °C (figure 2.1 A). Les résultats indiquent que la basse température amplifie le signal endothermique observé à 20 °C. Seulement un faible pic exothermique est observé à 10 °C, lors de la première injection. Donc, il est proposé que les signaux endothermiques sont associés à un phénomène favorisé à basse température, alors que les signaux exothermiques sont associés à un phénomène qui arrive principalement à des températures plus élevées. Ces deux phénomènes peuvent cohabiter, ou se faire compétition, comme le montre le thermogramme à 20 °C (figure 2.1 B). La figure 2.2 montre une expérience pendant laquelle la température a été modifiée en cours de titrage (de 20 à 37 °C). On y voit bien le passage de la présence de pics endothermiques (basse température) à des pics exclusivement exothermiques (haute température). Ce changement d'allure des signaux ITC est réversible lorsque l'on ramène la température à 20 °C.



**Figure 2.2 :** Injection de BSP ( $40 \mu\text{L}$ /injection d'une solution de concentration  $0,1 \text{ mM}$ ) sur des vésicules de POPC ( $10 \text{ mM}$ ). Les 7 premières injections sont à  $20^\circ\text{C}$ , les 7 autres à  $37^\circ\text{C}$ . La ligne pointillée indique le changement de température. Les 7 dernières injections débutent à un temps arbitraire de 600 minutes.

Les titrages de vésicules (LUV) de POPC/POPE (7/3) sont qualitativement similaires à ceux obtenus avec la POPC pure (données non illustrées); seuls des pics exothermiques ont été observés à  $37^\circ\text{C}$ , alors que les deux signaux (endothermiques et exothermiques) ont été détectés à  $20^\circ\text{C}$ . Les valeurs thermodynamiques obtenues avec ce système sont toutefois significativement différentes de celles observées pour la POPC pure. À  $37^\circ\text{C}$ , pour les membranes POPC/POPE, le ratio d'association lipides/protéine associée est estimé à  $54 \pm 4$ , et le  $\Delta H_{\text{mol}}$  est de  $-57 \pm 3 \text{ kJ/mol}$  (tableau I).



**Figure 2.3 :** Titrage calorimétrique isotherme de vésicules de POPC/POPG (7/3) par des protéines BSP A) à 20 °C (lipides 5 mM ; BSP 0.2 mM – 14 injections de 20 µl) et B) à 37 °C (lipides 0.5 mM ; BSP 0.2 mM – 7 injections de 40 µl). Seule la composante exothermique est observée en présence du POPG chargé négativement. Les contributions endo-(■) et exo-(●)thermiques sont montrées séparément.

L'association des protéines BSP aux membranes portant une charge négative a été investiguée en utilisant des vésicules (LUV) de POPC/POPG (7/3). Les résultats sont montrés à la figure 2.3.

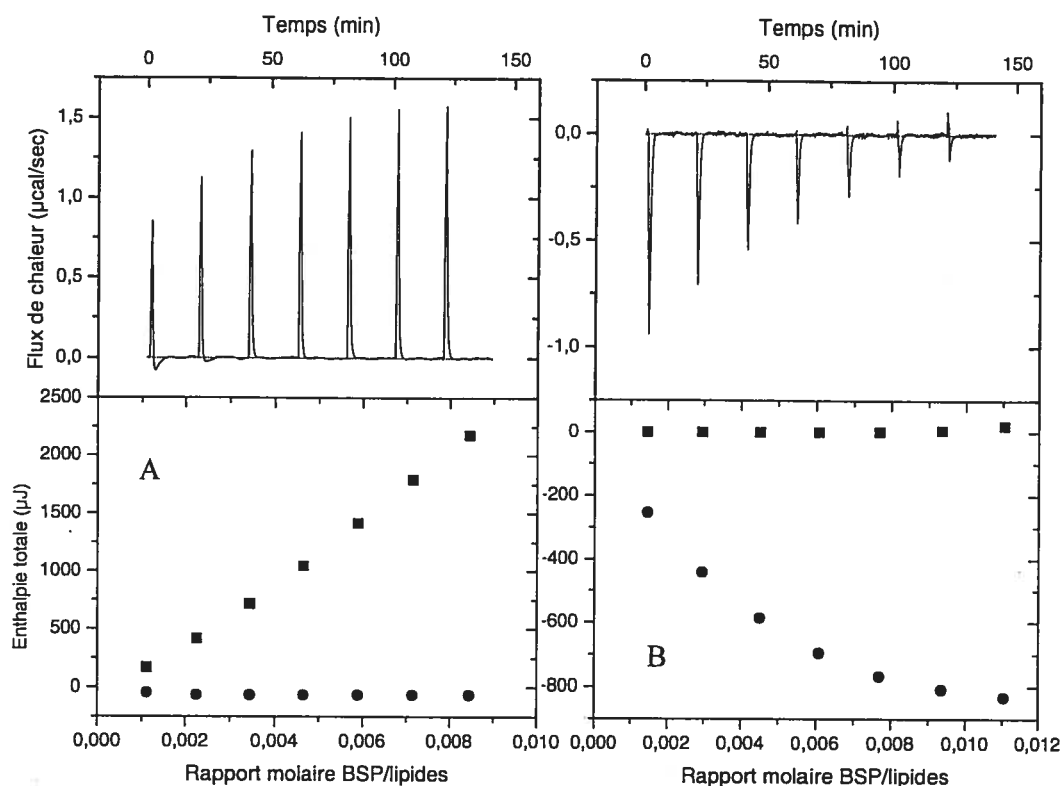
À 37 °C, le profil du titrage est similaire à celui obtenu avec des vésicules de POPC pure. On peut observer des pics exothermiques, dont l'aire diminue pendant le titrage. Comme pour les systèmes précédents, les valeurs de saturation de membrane par les protéines BSP et du  $\Delta H_{mol}$  ont été calculées, et sont respectivement de  $24 \pm 2$ , et  $-124 \pm 9$  kJ/mol (tableau I). À 20 °C,

seul le signal exothermique a été détecté en présence de POPG dans les vésicules. Il doit être noté que la concentration des lipides à 20 °C est de 5 mM, comme dans le cas du titrage avec POPC pure, pour faciliter la comparaison entre les deux systèmes.

Des expériences similaires ont été menées avec des membranes lipidiques contenant du cholestérol (POPC/Chol (7/3)), et les résultats sont présentés à la figure 2.4.

Les expériences à 37 °C n'ont montré que des pics exothermiques, tout comme les autres expériences faites à cette température avec les autres systèmes lipidiques étudiés. Dans le présent système, la concentration des lipides a été augmentée à 5 mM pour permettre l'obtention d'un titrage complet pour l'ajout de la même quantité de protéines. Ce phénomène indique de façon assez évidente que le ratio d'association lipides/protéine associée à la fin du titrage est considérablement plus élevé que dans tous les systèmes lipidiques étudiés précédemment. Aussi, pour déterminer le  $\Delta H_{\text{mol}}$  du système POPC/Chol, des injections de 40  $\mu\text{l}$  d'une solution de protéines BSP en concentration 0.1 mM à une suspension lipidique en concentration 10 mM ont été effectuées.





**Figure 2.4 :**Titrage calorimétrique isotherme de vésicules de POPC/Cholestérol (7/3) par des protéines BSP (lipides 5 mM ; BSP 0.2 mM – 7 injections de 40  $\mu$ l) A) à 20 °C et B) à 37 °C. Les signaux sont tous endothermiques à basse température, et tous exothermiques à haute température. Les contributions endo-(■) et exo-(●)thermiques sont montrées séparément.

Le ratio d'association (le nombre de lipides associés à une protéine BSP), ainsi que le  $\Delta H_{\text{mol}}$  pour ce système, est respectivement de  $254 \pm 20$  lipides/BSP associée, et  $-61 \pm 10$  kJ/mol (voir tableau I). À 20 °C, le titrage avec des protéines BSP montre seulement des pics endothermiques qui augmentent au cours du titrage.

### 2.3.2 Isothermes d'association

Les isothermes d'association (ou de partition) peuvent être définis par la variation de  $X_b$ , le rapport molaire de protéines liées à la membrane, en

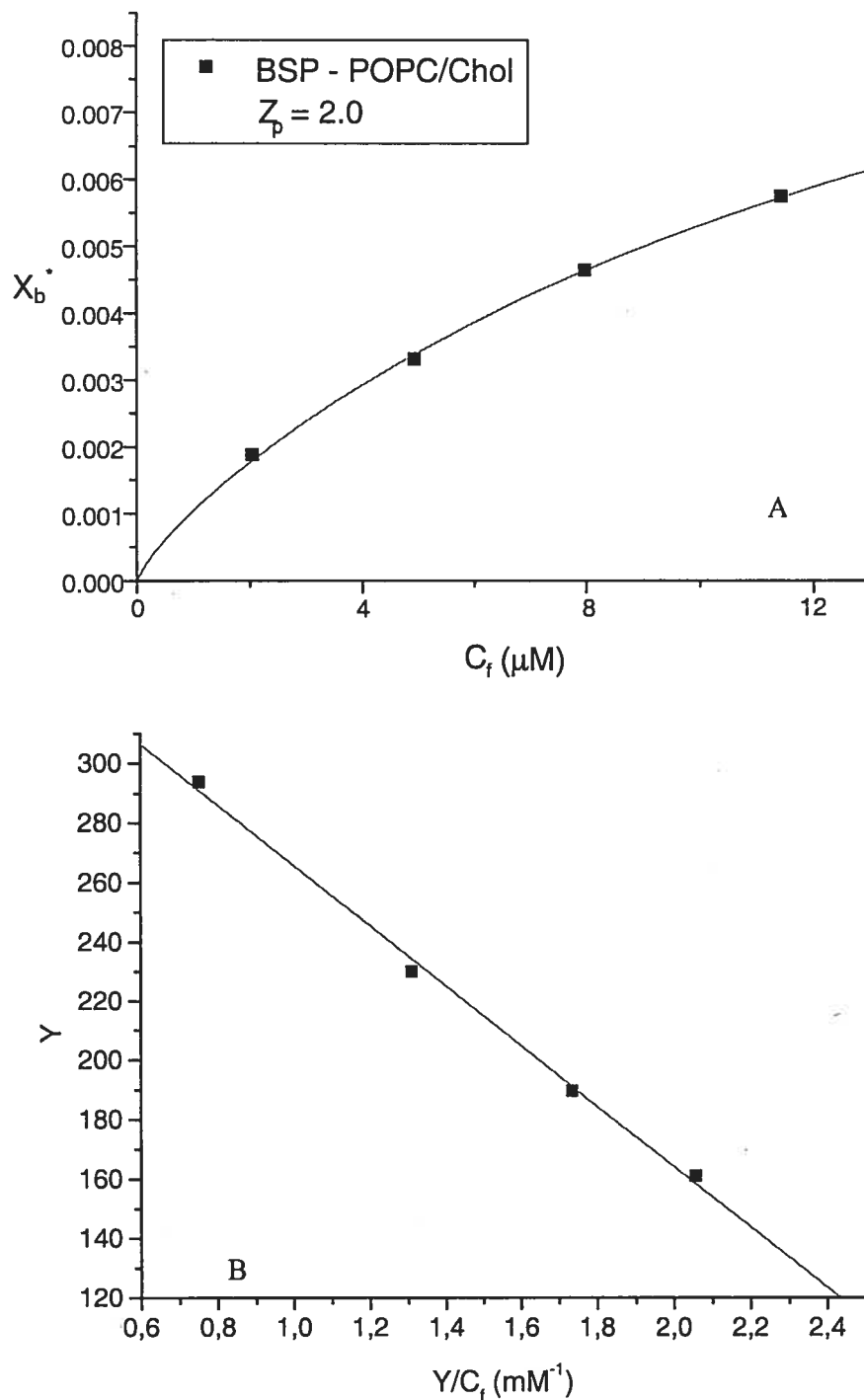
fonction de  $C_f$ , la concentration de protéine libre en solution. Un exemple d'isotherme d'association, pour le système POPC/Chol, est présenté à la figure 2.5 A. Cet isotherme, comme ceux associés aux autres systèmes étudiés, ne montrent pas une variation linéaire. Deux modèles ont été sélectionnés pour expliquer la courbure de ces isothermes.

### 2.3.3 Graphiques de type Scatchard

L'association des protéines BSP à des membranes lipidiques a pu être simulée à l'aide de graphiques de type Scatchard. Les données que nous avons obtenues ont produit des bonnes relations linéaires pour un graphique de type Scatchard; un exemple typique est donné à la figure 2.5 B. Les valeurs résultantes de  $K$  et  $n$  sont résumées dans le tableau II. Les données pour lesquelles  $\geq 90\%$  des protéines étaient liées ne sont pas incluses dans la simulation. L'incertitude sur ces faibles valeurs de  $C_f$  menait à de trop grandes variations du ratio  $Y/C_f$ .

Système	$K_{int}$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$n$ (lipides/site)
PC	$130 \pm 34$	$19 \pm 4$
PC/PG	$86 \pm 47$	$14 \pm 4$
PC/PE	$1246 \pm 210$	$48 \pm 3$
PC/Chol	$77 \pm 24$	$228 \pm 49$

**Tableau II :** Constantes de dissociation ( $K$ ) et nombre de lipides par site ( $n$ ) obtenus à l'aide du modèle de Scatchard, à 37°C. L'incertitude provient de duplicata. Les valeurs de  $n$  sont calculées en tenant compte des lipides des 2 feuillets de la bicouche.



**Figure 2.5 :** A) Isotherme d'association pour des protéines BSP (0.2 mM) se liant à une membrane de 7/3 POPC/Chol (5 mM). La ligne pleine est la simulation théorique des données, à partir de la constante d'affinité obtenue à l'aide du modèle d'association. B) Graphique de type Scatchard pour le même système. La ligne pleine représente la simulation linéaire.

### 2.3.4 Coefficient de partage

L'association des protéines BSP à des membranes lipidiques peut également être décrite par le coefficient de partage entre les protéines libres et les protéines liées (équation 1.7). Ainsi, la variation de la densité de charges à la surface de la membrane est responsable, dans ce modèle, de la courbure de l'isotherme. Dans le modèle utilisé [35, 41], nous avons simulé les isothermes d'association en considérant un gradient de concentration de protéine libre, de l'interface lipidique au cœur de la solution.  $K_f^{int}$  et  $Z_p$  ont été utilisés comme paramètres ajustables. La contribution du tampon MOPS (10 mM, pKa = 7.2, pH 7) à la force ionique du milieu a été considérée comme étant l'équivalent de 5 mM d'électrolyte monovalent en solution (équation 1.5). Le modèle a bien simulé les isothermes pour les 4 systèmes lipidiques étudiés, et des résultats typiques sont représentés à la figure 2.5 A. Les paramètres résultants des simulations sont présentés dans le tableau III, et sont discutées plus loin dans ce chapitre.

Système	$K_f^{int}$ (mM <sup>-1</sup> )	$Z_p$
POPC	25.7 ± 3.5	0.7 ± 0.1
POPC/POPG	0.017 <sub>a</sub> ± 0.012 78.5 <sub>b</sub> ± 57.0	1.3 ± 0.3
POPC/POPE	333 ± 76	1.6 ± 0.1
POPC/Chol	0.89 ± 0.24	2.0 ± 0.4

**Tableau III :** Coefficients de partage et charge effective de la protéine pour l'association des protéines BSP aux 4 systèmes lipidiques étudiés. L'incertitude sur les valeurs provient de duplicata.

a : Valeur attribuée seulement au transfert de la protéine dans la membrane lipidique.

b : Valeur incluant les interactions électrostatiques et le transfert de la protéine dans la membrane lipidique au début du titrage.

## 2.4 Discussion

### 2.4.1 $\Delta H_{mol}$ et ratio lipides/BSP liée

Les valeurs d'enthalpie molaire d'association (tableau I) sont influencées par la composition lipidique des vésicules. Les valeurs pour POPC pure, et les mélanges POPC/POPE et POPC/cholestérol sont comparables. Ceci suggère que les interactions lipides-protéines sont de la même nature dans ces trois systèmes. L'association des protéines BSP aux vésicules POPC/POPG a produit le  $\Delta H_{mol}$  le plus élevé. Cette différence est probablement causée par des interactions électrostatiques, et suggère que la présence de charges négatives sur la membrane a un effet sur l'interaction. Il est important de noter que les  $\Delta H_{mol}$  mesurés peuvent inclure la dissociation de multimères de BSP en mono- ou dimères lors de l'association aux membranes, car la technique ITC enregistre tous les phénomènes qui résultent de l'injection de BSP sur les lipides.

Des études précédentes [19, 26] ont proposé un ratio d'association maximal de 10-12 DMPC par protéine BSP, en considérant la concentration totale des lipides. Le ratio de saturation de la membrane calculé à l'aide de l'ITC est de 30:1 POPC/BSP (tableau I), en considérant tous les lipides présents dans la cellule expérimentale. Si nous tenons compte seulement des lipides de la couche externe des vésicules, le ratio de saturation est de 15:1 POPC/BSP. Cette valeur est donc similaire à celle qui est proposée dans la littérature. Des ratios plus élevés ont été obtenus avec les systèmes POPC/POPE (27 lipides par BSP, couche externe seulement) et POPC/cholestérol (127 lipides/BSP, couche externe seulement). On pourrait suggérer que ceci est une indication que les vésicules lipidiques ne sont pas complètement recouvertes de BSP, puisqu'elles ont la même taille que celles de POPC pure et POPC/POPG. Donc, la présence de cholestérol, et dans une moindre mesure POPE, semble modifier la stœchiométrie de l'interaction. Ceci pourrait être expliqué par l'ordre des chaînes acyles dans la membrane, qui est un peu réduite par la présence de POPE, et de façon plus efficace par la présence de cholestérol [62]. En se liant aux membranes, les protéines BSP

peuvent pénétrer à l'intérieur de la région hydrophobe et un empilement plus compact des chaînes acyles pourrait défavoriser ce phénomène. Autrement, l'insertion de la protéine pourrait induire une courbure à la bicouche. Cet effet dépend du module de courbure de la membrane. Donc, une membrane avec des chaînes plus désordonnées ou un rayon de courbure plus incompatible avec celui associé à la présence de la protéine défavoriserait l'insertion de la protéine dans les lipides. Dans le cas des vésicules contenant du cholestérol, la formation d'une phase liquide ordonnée (phase  $l_o$ ) pourrait également expliquer le ratio maximal d'association lipides/protéine BSP élevé. La formation d'une telle phase est connue pour réduire l'élasticité dans le plan des membranes [63]. Il pourrait donc être plus difficile pour les protéines BSP de pénétrer une telle membrane. La formation de la phase  $l_o$  en présence de cholestérol peut également mener à la formation de domaines lipidiques [64]. Ainsi, puisque les protéines BSP n'interagissent pas directement avec le cholestérol [7, 18, 28], il serait possible qu'elles évitent ces domaines riches en cholestérol, résultant en un recouvrement incomplet de la vésicule.

#### *2.4.2 Affinité selon le modèle de Scatchard*

Les valeurs de  $K$  obtenues avec le modèle de Scatchard (tableau II) suggèrent une affinité des protéines BSP pour les membranes lipidiques étudiées dans l'ordre suivant : POPC/POPE > POPC > POPC/POPG > POPC/cholestérol. Cet ordre est différent de celui trouvé dans la littérature [19]. Les valeurs de  $n$ , calculées en considérant tous les lipides présents dans la cellule expérimentale, proposent que le nombre de protéines BSP liées dépend de la composition lipidique de la vésicule. Les valeurs obtenues sont en accord avec les ratios molaires d'association obtenus directement des données ITC (tableau I). Les valeurs de  $n$  suggèrent que les vésicules composées de POPC et de POPC/POPG peuvent accepter un plus grand nombre de protéines que celles faites de POPC/POPE, et encore plus que celles composées de POPC/cholestérol. Les explications mentionnées plus haut pourraient donc s'appliquer après l'analyse avec le modèle de Scatchard.

### 2.4.3 Affinité selon le modèle du coefficient de partage

Le présent ouvrage présente les résultats du ratio de saturation et des constantes d'affinité des protéines BSP pour 4 mélanges lipidiques à 37 °C. Ces résultats suggèrent une interaction entre les protéines BSP et les membranes lipidiques étudiées. Ils proposent également qu'il existe une spécificité lipidique lors de cette interaction. Selon nos valeurs de  $K_f^{int}$ , l'affinité des protéines BSP pour les membranes étudiées serait POPC/POPE > POPC/POPG > POPC > POPC/cholestérol. En ce qui concerne le ratio molaire de saturation, il va comme suit : POPC ≈ POPC/POPG > POPC/POPE > POPC/cholestérol. Ces résultats sont ici mis en parallèle avec ceux calculés par résonance paramagnétique électronique (RPE) présentés dans la littérature [19]. Il est toutefois important de mentionner que les deux méthodes ici comparées (RPE et ITC) sont très différentes l'une de l'autre. Les systèmes investigués sont différents. Les systèmes étudiés en RPE sont constitués d'une matrice de POPC avec 1% de l'autre lipide (sauf dans le cas du cholestérol). Pour les études en ITC, les systèmes sont constitués de matrices mixtes de lipides (PC/PG, PC/PE, PC/cholestérol) contenant 30% du second lipide. De plus, la détection du signal (échange de chaleur versus immobilisation des lipides) n'apporte pas la même vision de l'association. Ces différences importantes entre les méthodes conduisent à des résultats complémentaires qui ne peuvent être simplement comparés.

L'association des protéines aux vésicules de POPC a donné un coefficient de partage de  $25.7 \text{ mM}^{-1}$  (0.039 mM) avec un ratio molaire de saturation de 15 lipides/BSP (lipides externes seulement). La valeur du coefficient de partage est un ordre de grandeur plus grand que celui mesuré par Desnoyers et coll. [15] avec du chlorure de choline, et beaucoup plus faible que celui calculé à l'aide de la résonance plasmonique de surface (SPR) où une valeur de  $2.11 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  ( $4.74 \times 10^{-5} \text{ mM}$ ) est rapportée [21] pour une membrane de DMPC.

Les charges effectives ( $Z_p$ ) simulées avec le modèle du coefficient de partage sont présentées dans le tableau III. Les 4 systèmes étudiés montrent des charges similaires, variant entre +0.7 et +2. Il est important de mentionner que c'est le système POPC/POPG qui nous a permis de déterminer le signe (+) de la charge effective de la protéine, puisque la protéine était la seule espèce chargée dans les 3 autres systèmes étudiés. Les protéines BSP ont été reconnues comme étant acides avec un point isoélectrique (PI) situé entre 4.7 et 5.2 [65]. Toutefois, la présence de résidus chargés positivement dans les deux domaines apparentés à la fibronectine (Arg31, 33, 57 et 104 ; Lys34, 59, 78, 85, 102 et 107) pourraient créer une charge effective positive à l'interface de la membrane lipidique. Toutefois, la contribution de la protéine à la charge interfaciale dépend de l'orientation de la protéine à la surface, ce qui est pour le moment indéterminé. D'autres études rapportent également des charges effectives de plus petits peptides qui ne correspondent pas à leur charge absolue en solution [48, 49], probablement parce les approximations dans l'approche Gouy-Chapman ne sont pas parfaitement respectées lorsqu'elles sont appliquées aux peptides et aux protéines. Par exemple, le modèle est élaboré à partir de charges ponctuelles, ce qui est une approximation plutôt grossière pour une protéine de 15 kDa.

#### 2.4.4 Affinité pour les bicouches lipidiques

##### 2.4.4.1 Affinité avec POPC

Des études en résonance paramagnétique électronique (RPE) [19] montrent que les protéines réduisent la mobilité des chaînes acyles des phospholipides jusqu'au 14<sup>e</sup> carbone lors de l'association, suggérant une pénétration des protéines dans le cœur hydrophobe de la membrane. Donc, le coefficient de partage calculé par ITC pourrait refléter l'affinité des protéines BSP pour la tête choline ainsi qu'une contribution associée à l'interaction avec la partie hydrophobe des membranes de POPC. Il est toutefois impossible de différencier les deux interactions possibles avec la technique ITC.



#### 2.4.4.2 Effet de POPG sur l'affinité

La présence de POPG, chargé négativement, dans les membranes de POPC n'affecte pas, à l'intérieur de la précision de nos mesures, l'affinité des protéines BSP pour les membranes, à la lumière des  $K_{int}$  obtenus par le modèle de Scatchard. Le coefficient de partage  $K_f^{int}$  calculé pour le système POPC/POPG est très bas relativement à celui obtenu pour une bicouche de POPC ( $0.017 \text{ mM}^{-1}$ , comparé à  $25.7 \text{ mM}^{-1}$  pour la POPC pure). Il est important de rappeler que ce coefficient est en fait associé au transfert des protéines BSP de l'environnement aqueux près de l'interface à l'intérieur des membranes lipidiques. Dans le modèle, les interactions électrostatiques à longue distance sont exclues de la valeur de  $K_f^{int}$ , et sont prises en charge par le modèle de Gouy-Chapman. La charge effective de la protéine étant positive, il y a un enrichissement en protéines près de la surface de la membrane lipidique ; cette concentration « augmentée » (identifiée ici par  $C_M$ ), est largement responsable de la faible valeur de  $K_f^{int}$ . Le gradient de concentration de protéines, du cœur de solution vers l'interface de la membrane lipidique, est donné par l'équation 1.6.

Avec une bicouche contenant 30% de PG, nous pouvons estimer que la densité de charge à la surface de la membrane est de  $-0.07 \text{ C/m}^2$ , et conséquemment le potentiel de la membrane à l'interface serait de  $-0.15 \text{ V}$  au début du titrage. Lors de la première injection du titrage des vésicules de POPC/POPG, la concentration des protéines BSP à l'interface a été estimée étant environ 3000 fois plus grande que la concentration dans le cœur de solution. Comme  $K_f^{int}$  décrit la partition de la protéine entre la forme liée et libre à proximité de l'interface, cette grande concentration en protéine conduit à une faible valeur de cette constante.

L'expression  $z_p F_0 \Psi_0$ , donne l'énergie libre de Gibbs associée au transfert de la protéine du cœur de solution vers l'interface de la membrane ( $\Delta G_{\text{électro}}$ ) (c.à.d. une description des interactions électrostatiques à longue distance). La somme de  $\Delta G_{\text{électro}}$  et de  $\Delta G_{\text{transfert}}$ , calculé à l'aide de  $K_f^{int}$ , donne l'énergie

libre de Gibbs totale associée au transfert de la protéine du cœur de la solution vers la membrane. En considérant l'énergie libre de Gibbs totale, le coefficient de partage est de  $78.5 \text{ mM}^{-1}$  pour la première injection, ce qui est du même ordre de grandeur que celui calculé avec POPC pure. Ceci suggère que les interactions des protéines BSP avec les membranes de POPC/POPG sont principalement influencées par les forces électrostatiques, et pourraient donc expliquer la valeur élevée de  $\Delta H_{\text{mol}}$  mentionnée plus haut.

#### 2.4.4.3 Effet de POPE sur l'affinité

L'addition de POPE aux vésicules de POPC a eu un effet notable sur le coefficient de partage. Le coefficient ( $333 \text{ mM}^{-1}$ ) calculé pour ce système est le plus élevé de tous. Donc, la présence de POPE dans les membranes semble faciliter l'insertion des protéines BSP, même si moins de protéines ont pu être ajoutées sur les vésicules. Il a été montré que POPC et POPE formaient un mélange homogène en phase fluide [62]. Des études en résonance paramagnétique électronique (RPE) [27] ont montré que les protéines BSP provoquent l'immobilisation de lipides portant la tête PE insérés dans une membrane de PC, bien que dans la bicouche, la protéine s'entoure préférentiellement de PC par rapport à PE. Ceci suggère, d'une part, que les protéines interagissent avec les lipides PC assez fortement pour immobiliser d'autres espèces lipidiques placées dans le même environnement. D'autre part, une interaction directe protéine BSP-PE ne semble pas être à l'origine de la grande affinité que nous mesurons. Il est possible que la présence de POPE donne à la bicouche des propriétés favorisant l'affinité de la protéine. Par exemple, la taille réduite de la tête polaire de PE pourrait mieux accommoder la courbure impartie par la protéine insérée. Des études supplémentaires sont nécessaires pour fournir les détails moléculaires de cette affinité. Nous pouvons toutefois affirmer que même si les protéines BSP ont une affinité spécifique pour PC, il se peut qu'elles possèdent plus d'affinité pour une bicouche mixte PC/PE, qui est hétérogène, que pour une bicouche de PC pure. Ainsi, nous pouvons mentionner que la présence de POPE dans la membrane conduit à des propriétés qui favorisent l'interaction avec la protéine BSP, bien que

localement, la protéine ne s'entoure pas préférentiellement de ce lipide. Il faut rappeler que la proportion utilisée de PE dans la bicouche, lors des expériences RPE n'était que de 1%, en contraste avec 30% utilisé dans les présents travaux.

Il est intéressant de noter que la membrane des spermatozoïdes contient une quantité appréciable de PE (14% de la composition lipidique des spermatozoïdes de boucs [8]). Donc, les lipides portant la tête PE pourraient jouer un rôle, chimique ou structural, dans l'association des protéines BSP aux membranes lipidiques modèles. La présence de PE dans les membranes de spermatozoïdes semble être essentielle pour la réaction acrosome, en influençant la fluidité de la membrane, tout comme le cholestérol [8].

#### *2.4.4.4 Effet du cholestérol sur l'affinité*

Pour investiguer si le cholestérol modifie l'affinité des protéines BSP pour POPC, le stérol a été inséré dans des vésicules de POPC. Le coefficient de partage mesuré pour ce système ( $0.89 \text{ mM}^{-1}$ ) est 30 fois plus faible que celui mesuré pour POPC pure. Donc, le cholestérol semble avoir une influence importante sur l'association. Comme mentionné précédemment, la formation d'une phase liquide ordonnée ( $l_o$ ) pourrait être responsable de la faible valeur du coefficient de partage. Cette phase ordonnée tend à augmenter la rigidité de la membrane, rendant plus difficile l'insertion des protéines dans la vésicule lipidique. De plus, cette augmentation de rigidité pourrait limiter la courbure de la membrane lors de l'interaction, résultant en une baisse du coefficient de partage. De plus, les protéines BSP pourraient éviter les domaines riches en cholestérol, diminuant ainsi le nombre de protéines interagissant avec les vésicules, en accord avec le ratio molaire de saturation lipide/protéine élevé obtenu. Par RPE, il est montré que le cholestérol n'interagit pas directement avec les protéines BSP [7, 28, 66]. Cependant, la

RPE montre aussi que la présence du cholestérol augmente l'association entre les protéines BSP et différents lipides dans des membranes de DMPC [29]. Cette affirmation est toutefois basée sur le fait que la présence du cholestérol augmenterait le nombre de sites d'association sur les protéines BSP. Les auteurs mentionnent qu'il est peu probable que la stœchiométrie de l'interaction soit modifiée en présence de cholestérol, alors que notre étude en ITC semble montrer que ce n'est pas le cas. Les informations contenues dans [29] suggèrent que la constante d'association pour PC reste la même en absence et en présence de cholestérol, alors que notre étude en ITC montre une variation de la constante d'association si le cholestérol est inséré dans les membranes de POPC. Les informations sur l'association déterminées par RPE sont calculées en tenant compte d'hypothèses différentes des nôtres ; ils reposent sur une interaction de proximité (immobilisation d'une sonde dans une matrice de lipides) tandis que nos mesures sont associées au comportement global. Toutefois, la différence entre les deux méthodes mises en parallèle pourrait expliquer le fait que les résultats obtenus ne concordent pas totalement. De plus, il est possible que les bicouches de DMPC se comportent différemment de celles formées par POPC. Il est donc difficile de comparer nos résultats avec ceux obtenus par RPE.

#### *2.4.5 Influence de la température sur l'association des protéines BSP aux lipides*

Les expériences menées en ITC sur l'association des protéines BSP aux membranes lipidiques ont produit deux signaux distincts, un étant endothermique, l'autre étant exothermique. La contribution relative de ces deux composantes dépend de la composition lipidique de la membrane, et de la température. La tendance observée suggère que l'intensité du signal endothermique augmente en fonction de l'ordre de la région hydrophobe de la membrane, puisque cette composante devient plus importante lorsque la température est plus basse, et lorsque le cholestérol est inséré dans les

membranes. Le cholestérol est connu pour augmenter l'ordre des membranes en phase fluide [63], un effet également observé sur les membranes de spermatozoïdes [67]. L'effet de la température est moins prononcé dans le système contenant du POPG dans les membranes. L'assignation d'un évènement précis à chacun des signaux observés est spéculative. Toutefois, il y a des indications dans la littérature que les protéines BSP existent sous forme d'agrégats et sous forme dispersée [23], et que l'équilibre entre les mono-, dimères et la forme agrégée serait influencé par la température [23, 25], ainsi que par l'association à l'o-phosphorylcholine [23]. Il est mentionné que la forme agrégée est favorisée à des températures situées sous 36 °C, alors qu'au-dessus de cette température, les formes mono- et dimères sont présentes en plus grand nombre [23]. Ainsi, il est possible que les phénomènes menant aux pics endo- et exothermiques correspondent à deux évènements distincts. Pour les expériences menées à 37 °C, donc au-dessus de 36 °C, seuls les signaux exothermiques sont observés. Ces signaux pourraient être attribués à l'insertion de protéines BSP sous forme mono- et dimères dans les membranes, puisque c'est cette forme qui est prédominante à cette température. Pour les expériences menées à 20 et à 10 °C, les pics endothermiques sont observés, parfois en concomitance avec les pics exothermiques. Les pics endothermiques, qui apparaissent toujours avant les pics exothermiques, pourraient alors être associés à la dissociation des agrégats de protéines lorsqu'elles arrivent près de la membrane. Ensuite, les pics exothermiques observés pourraient être associés à la pénétration des protéines désagrégées dans la membrane, tel qu'observé à 37 °C. Il a été mentionné plus haut que l'intensité des pics endothermiques augmentait avec la rigidité de la membrane. Il a également été mentionné que plus la membrane devenait rigide, plus le ratio molaire de saturation lipides/BSP augmentait. Ainsi, l'absence de pics exothermiques sur certains thermogrammes (à 10 °C pour POPC, 20 °C pour le cholestérol) pourrait être expliquée par le fait que tellement peu de protéines s'insèrent dans la membrane que le signal endothermique associé à la dissociation des multimères devient alors prédominant, masquant les autres évènements.

L'influence de la température sur l'association des protéines BSP à des bicouches lipidiques a été investiguée par résonance plasmonique de surface (SPR) [21]. Cette analyse, faite à l'aide d'une équation de type Arrhenius, a mené à la détermination de valeurs de  $\Delta H_{\text{mol}}$  d'association ; les mesures dans cette étude ont été faites entre 6 et 20 °C. La valeur de  $\Delta H_{\text{mol}}$  reportée pour les bicouches de DMPC contenant du cholestérol est de + 7 kJ/mol. Cette valeur endothermique est qualitativement en accord avec nos observations en ITC pour le système POPC/cholestérol à 20 °C. Cette même étude [21] reporte que le  $\Delta H_{\text{mol}}$  d'association devient négatif lorsque DMPG est inséré dans les membranes de DMPC. Ceci est également en accord avec nos observations pour le système POPC/POPG à 20 °C.

## *2.5 Conclusions*

Ce chapitre montre que les protéines BSP interagissent avec des vésicules lipidiques de différentes compositions. Il est proposé que les protéines BSP ont une plus grande affinité pour les vésicules lorsque la tête PE est présente, ce qui est différent de ce qui a été publié. Puisque PE fait partie de la composition lipidique des spermatozoïdes, il serait intéressant de continuer les recherches dans ce sens. Le tableau IV résume les effets des différents lipides insérés dans nos bicouches de POPC, celles-ci étant considérées comme référence.

Présence de POPG	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Charge négative influence fortement le gradient de concentration des protéines BSP près de la membrane.</li> <li>- Enthalpie molaire d'association élevée.</li> </ul>
Présence de POPE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La plus grande affinité mesurée.</li> <li>- Plus grand nombre de lipides / BSP lors de la saturation de l'association, en comparaison avec POPC.</li> <li>- Semble favoriser l'insertion des protéines BSP dans la membrane</li> </ul>
Présence de cholestérol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La plus faible affinité mesurée.</li> <li>- Le plus grand nombre de lipides / BSP lors de la saturation de l'association.</li> <li>- Phase liquide ordonnée rigidifie les membranes.</li> <li>- Formation de domaines riches en cholestérol qui n'interagissent pas avec les protéines BSP</li> </ul>

**Tableau IV :** Résumé des effets de l'insertion de différents lipides dans les membranes de POPC lors de l'association avec les protéines BSP.

Un effet important de la température sur l'association des protéines BSP aux membranes lipidiques est également rapporté. Cet effet semble indiquer que la structure et la capacité d'association des protéines aux membranes dépendent de la température. Avec les bicouches de POPC, des changements importants sont observés autour de 36 °C, température à laquelle les protéines BSP passeraient d'une forme agrégée à une forme mono- et dimère. Il est possible que la nature utilise un gradient thermique pour synchroniser l'interactions des protéines BSP avec les membranes avec le cheminement du spermatozoïde ; toutefois, aucune investigation à ce sujet

n'a été faite dans le cadre cet ouvrage. Cet aspect serait donc également intéressant à investiguer plus en détails.



# Chapitre 3

## Spectroscopie infrarouge des protéines BSP et des interactions BSP/lipides

### 3.1 Introduction

Dans ce chapitre, l'étude par spectroscopie infrarouge à une et deux dimensions des protéines BSP et de leurs interactions avec les membranes lipidiques sera présentée. Ce chapitre est un complément des résultats du chapitre 2.

### 3.2 Matériel et méthodes

#### 3.2.1 Produits chimiques

Les lipides utilisés, soient la 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC), la 1,2-dimyristoyl-d<sub>54</sub>-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC<sub>D54</sub>), et le 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-[phospho-rac-(1-glycérol)] (sel de sodium) (DMPG) ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) et utilisés sans autre purification. Les autres composés chimiques ont été obtenus tel que décrit à la section 2.2.1.

#### 3.2.2 Spectroscopie infrarouge

Les expériences en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été effectuées sur un spectromètre FTS-25 de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Cambridge, MA) équipé d'un détecteur au sulfate de triglycine deutérée (DTGS) et d'une source global refroidie à l'eau. Puisque la bande de déformation de l'eau interfère grandement avec la bande Amide I des protéines, les protéines BSP ont été dissoutes dans de l'eau deutérée (D<sub>2</sub>O) pour permettre l'échange des protons labiles de la protéine avec les

deutérons. Cette solution a été lyophilisée, puis la poudre de protéines a été redissoute dans un tampon MOPS préparé dans le D<sub>2</sub>O (10 mM, pH 7.4). La concentration finale des échantillons de protéines BSP était de 3% (poids/poids). Un aliquot de ~10 µl a été placé entre deux fenêtres de CaF<sub>2</sub> séparées par un espaceur en téflon de 5 µm ou en mylar de 13 µm. Le porte-échantillon est associé à un contrôleur de température construit aux ateliers du département. Pour les échantillons contenant des lipides (DMPC-BSP), ces derniers ont d'abord été dissous dans un mélange 95:5 (volume/volume) benzène-méthanol pour être lyophilisés. Ensuite, la poudre lipidique a été hydratée dans le tampon MOPS (10 mM) préparé dans le D<sub>2</sub>O. La suspension fut soumise à 5 cycles de gel-dégel (de l'azote liquide à 40°C, température plus élevée que la température de transition de phase des lipides utilisés) pour permettre une bonne hydratation. Un volume approprié de solution de protéines BSP a été ajouté à la suspension lipidique pour obtenir le rapport lipides/protéine désiré. Les mélanges ont été soumis à 5 cycles de gel-dégel additionnels (de l'azote liquide à ~37°C, pour éviter toute dénaturation de la protéine). Le choix des lipides utilisés, DMPC et DMPG, est en partie justifié par leur température de transition autour de 23°C, ce qui permet une incubation adéquate sans risque de dénaturation de la protéine. La concentration finale de protéines était de 3% (poids/poids). Un aliquot d'environ 10 µl a été analysé.

Les spectres ont été enregistrés entre 20 et 70 °C, en chauffant. Chaque acquisition de spectre était précédée d'une période de 4 minutes pour permettre l'équilibre thermique. Chaque spectre est le résultat de l'addition de 100 balayages. Un spectre de référence a été enregistré à chaque changement de température. L'analyse spectrale a été réalisée à l'aide du logiciel Grams/32 (Thermo Galactic, Salem, NH). Pour la bande Amide I', un polynôme d'ordre 3 a été déterminé entre 1605 et 1705 cm<sup>-1</sup> pour simuler la ligne de base. Pour les bandes associées aux élongations C-H et C-D, un polynôme d'ordre 3 a été calculé entre 3030 et 2790 cm<sup>-1</sup>, et entre 2280 et 2000 cm<sup>-1</sup> respectivement pour simuler le flanc de la bande d'élongation O-D de l'eau. Le centre de gravité de la partie supérieure des bandes (les points

correspondant à  $\geq 95\%$  de l'intensité maximale) a été déterminé. On peut donc suivre l'évolution du maximum de la bande en fonction de la température et ainsi estimer des températures de transition (lipides) ou de dénaturation (protéine).

La simulation des composantes de la bande Amide I' a été faite comme suit, toujours à l'aide du programme Grams/32. Par inspection visuelle des spectres, un minimum de 4 composantes semble être inclus dans la bande Amide I'. Une première simulation du spectre à plus basse température (20 °C) a permis de déterminer les fréquences, largeurs de bandes, hauteurs et pourcentages de fonction Lorentzien (les composantes sont simulées par des fonctions qui sont des produits de fonctions Gaussiennes et Lorentziennes en proportions variables) des 4 composantes pour la protéine seule en solution et pour celle mise en présence de lipides. Cette procédure permet une simulation adéquate des spectres. Pour la simulation des autres spectres, la fréquence, la largeur et le pourcentage de fonction Lorentzien de chacune des composantes ont été fixés, et seules les hauteurs des quatre composantes étaient variables. Ces contraintes sont nécessaires pour guider l'algorithme vers des solutions cohérentes.

Les cartes en spectroscopie infrarouge 2D ont été générées et analysées à l'aide du logiciel Win-IR Pro de Bio-Rad (version 2.97). Le calcul de ces cartes est fait à partir de spectres de différences, qui montrent l'intensité du changement de la bande Amide I' par rapport à une référence donnée. Les spectres de référence pour ces soustractions sont : BSP seule dans MOPS deutéré, à 20 °C, pour la section A de la figure 3.12, et le mélange 15:1 DMPC/BSP dans MOPS deutéré, à 20°C, pour la section B de la même figure. La comparaison entre les cartes 2D est possible si on normalise la sensibilité (axe Z) pour toutes les cartes. Ici, l'axe Z a été fixé à la valeur correspondant au maximum d'intensité de changement, donné par la carte synchrone de BSP seule en solution, entre 45 et 70 °C. Il est ainsi possible de comparer la grandeur des changements entre les cartes

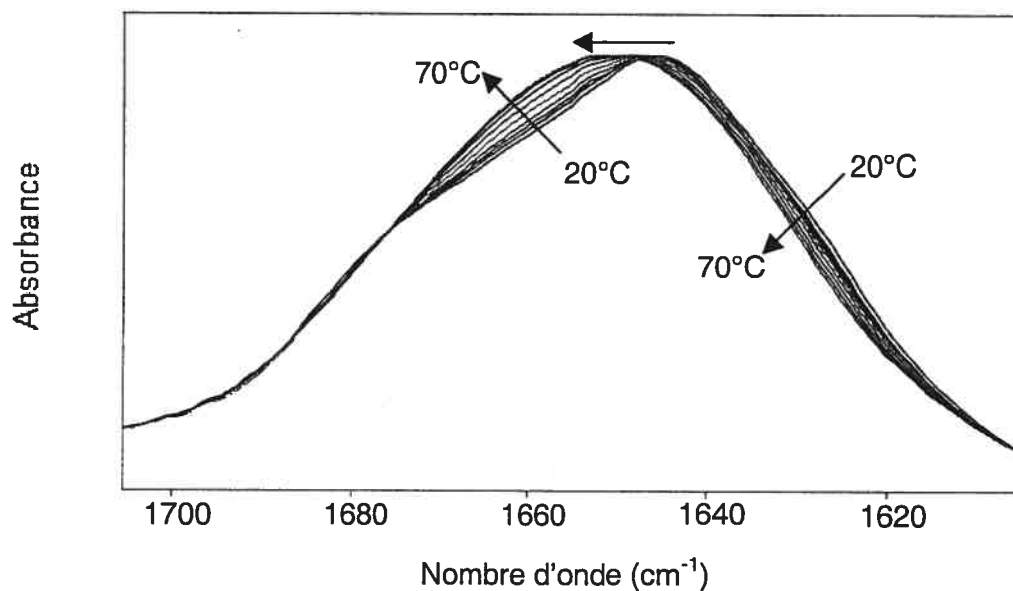
### 3.2.3 *Microcalorimétrie à balayage*

Les échantillons de protéine BSP en solution (0.2 mM BSP dans MOPS 10 mM) ont été soumis à des balayages de 10 à 80 °C, à une vitesse de balayage de 20 °C/h. Les thermogrammes ont été enregistrés avec un microcalorimètre VP-DSC de MicroCal (Northampton, MA).

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Dénaturation des protéines BSP en solution

La forme de la bande Amide I' du spectre de la protéine en solution change légèrement lors de l'augmentation de la température, comme montré sur la figure 3.1.

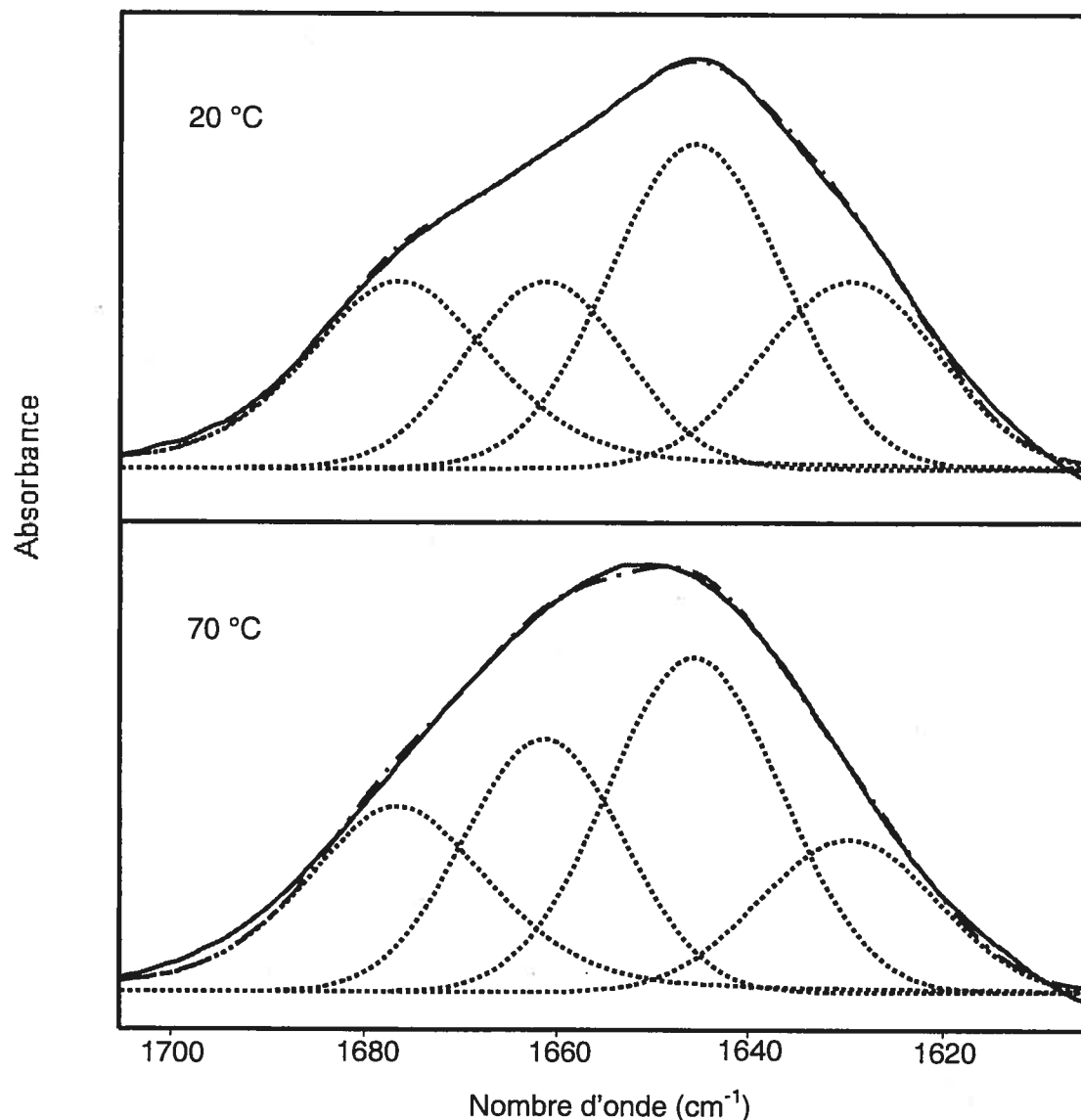


**Figure 3.1 :** Évolution de la bande Amide I' des protéines BSP en solution en fonction de la température.

On peut d'abord observer que le maximum de la bande se déplace de 1646 à 1651  $\text{cm}^{-1}$  lorsque la température passe de 20 à 70 ° C. Simultanément, l'intensité vers 1660  $\text{cm}^{-1}$  augmente alors que celle près de 1630  $\text{cm}^{-1}$  diminue. Les spectres montrent une bande incluant plusieurs composantes non résolues.

La bande Amide I' de tous les spectres de la protéine en solution a été simulée avec 4 composantes spectrales. Des résultats typiques de

simulation sont présentés à la figure 3.2. L'attribution de ces bandes, basée sur la littérature [23], est présentée dans le tableau IV. La structure secondaire de la protéine est principalement composée de segments désordonnés, et de tours et feuillets  $\beta$ . Ceci est en accord avec ce qui a déjà



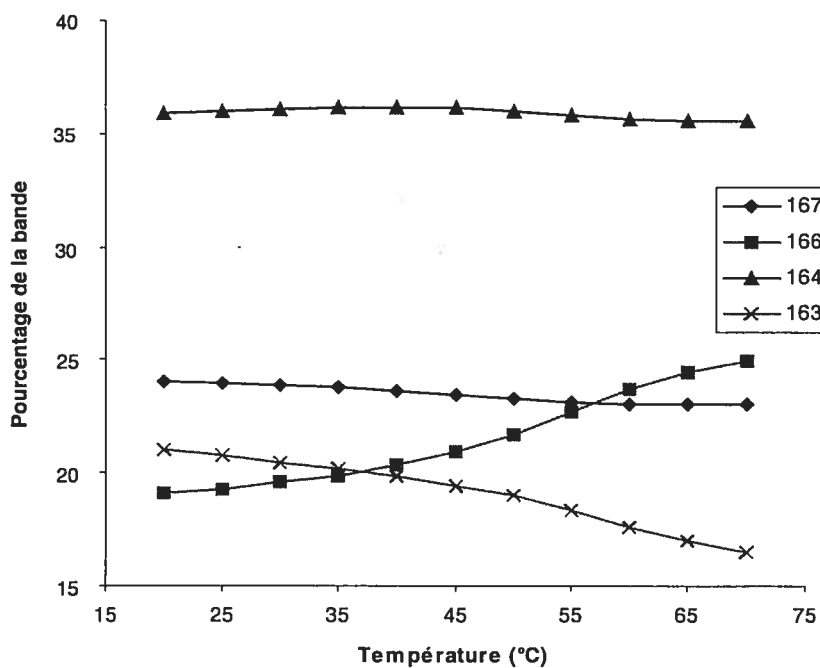
été observé dans une autre étude IR [23] et avec les résultats de diffraction de R-X [16] et RMN [14].

**Figure 3.2 :** Évolution des composantes simulées en fonction de la température pour la protéine BSP en solution. La figure présente les spectres expérimentaux (—), les spectres simulés (---) et leurs composantes (····).

Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Attribution	Aire à 20°C ( $\pm 2\%$ )	Aire à 70°C ( $\pm 2\%$ )
1676	Tours	24	23
1661	Hélices $\alpha$ , boucles protégées du solvant	19	25
1646	Segments désordonnés, boucles exposées au solvant	36	36
1630	Feuillets $\beta$	21	16

**Tableau V :** Attribution de chacune des composantes spectrales simulées et leurs pourcentages respectifs à 20 et 70 °C pour la protéine libre en solution. L'attribution des fréquences provient de la littérature [23] ( $n = 2$ ).

La figure 3.3 illustre l'évolution de l'aire des composantes simulées en fonction de la température.

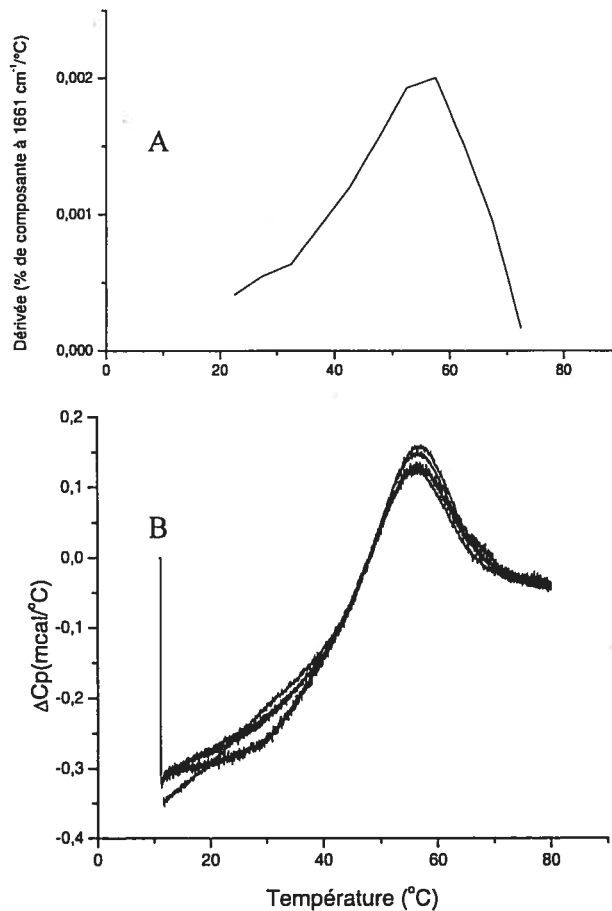


**Figure 3.3 :** Évolution des pourcentages respectifs des composantes de la bande Amide I' en fonction de la température.

Cette figure illustre bien que ce sont les bandes à  $1661$  et à  $1630\text{ cm}^{-1}$  qui changent en fonction de la température, alors que l'aire des deux autres reste à peu près constante tout le long de l'expérience. Ces résultats montrent bien que sous l'effet de l'augmentation de la température, les protéines BSP perdent des feuillets  $\beta$  qui se transforment en hélices  $\alpha$  et en boucles protégées du solvant. Ces changements se produisent de façon progressive entre  $35$  et  $65\text{ }^\circ\text{C}$ . La dérivée de la courbe associée à la composante située à  $1661\text{ cm}^{-1}$ , comme celle de la composante à  $1630\text{ cm}^{-1}$ , montrent un maximum vers  $55\text{ }^\circ\text{C}$  (figure 3.4). Ces comportements sont d'ailleurs en accord avec la littérature [23, 26].

La figure 3.4 B montre également les thermogrammes obtenus pour la protéine en solution. Tout comme par spectroscopie IR, ces résultats indiquent une transition thermique vers  $55\text{ }^\circ\text{C}$ . Ces résultats sont partiellement en accord avec la littérature. En effet, l'équipe de Gasset et coll. [23] a obtenu deux transitions thermiques, à  $36$  et  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , pour les protéines BSP dans des conditions identiques. Nous n'observons que la seconde transition (à  $55\text{ }^\circ\text{C}$ ) et malgré plusieurs répétitions de l'expérience, nous n'avons jamais observé celle à  $36\text{ }^\circ\text{C}$ . Notre valeur d'enthalpie associée à la transition observée ( $127\text{ kJ/mol}$ ) est également significativement différente de celle observée par Gasset et coll. ( $217\text{ kJ/mol}$ ) pour la transition à  $55\text{ }^\circ\text{C}$  [23]. Ces différences pourraient entre autres provenir du fait que les protéines BSP n'ont pas été isolées et purifiées par la même équipe, ce qui pourrait apporter des changements au mélange de protéines obtenu après purification.

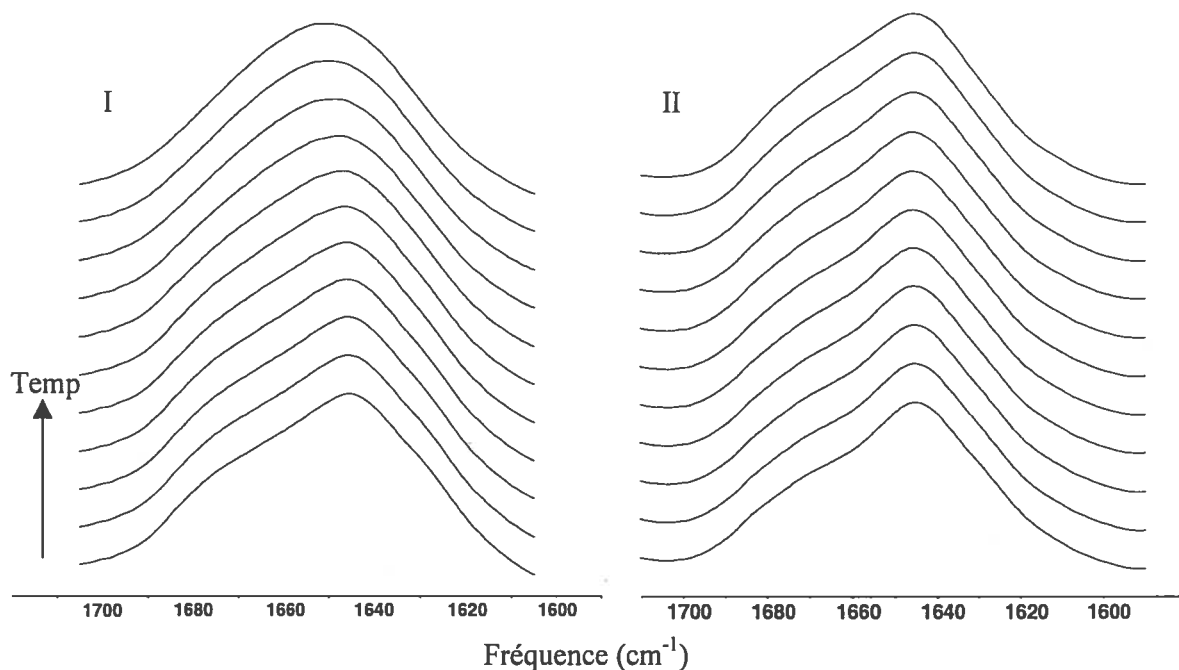




**Figure 3.4 :** A) Dérivée de l'évolution de la composante à 1661 cm<sup>-1</sup> en fonction de la température, en comparaison avec (B) les résultats obtenus en microcalorimétrie à balayage. (4 balayages successifs sur le même échantillon)

### 3.3.2 Dénaturation des protéines BSP en présence de phospholipides

La dénaturation des protéines BSP a également été investiguée en présence de DMPC. La figure 3.5 montre l'évolution de la bande Amide I' en fonction de la température alors que les protéines BSP sont mises en présence de lipides.



**Figure 3.5 :** Influence de la température (entre 20 et 70 °C, bonds de 5 °C) sur la bande Amide I' des protéines BSP I) seules en solution et II) dans un mélange de ratio molaire égal à 15:1 DMPC/BSP.

À 20 °C, la bande Amide I' en présence de lipides est très semblable à celle observée lorsque la protéine est seule. On note un léger déplacement du maximum de la bande vers les basses fréquences, qui passe de 1646 à 1644  $\text{cm}^{-1}$ . Pour détailler les changements de la bande Amide I', la simulation de bandes a également été utilisée. Les fréquences des bandes obtenues lors de la simulation du spectre de la protéine en présence des lipides, à 20 °C, sont très semblables (1676, 1660, 1644 et 1628  $\text{cm}^{-1}$ ) à celles obtenues avec la protéine seule en solution, confirmant le peu de différence au niveau des éléments de structure secondaire. La comparaison de nos travaux avec ceux de la littérature [23] montre que la structure secondaire des protéines BSP liées à des membranes de DMPC ou à la phosphorylcholine est très semblable. Toutefois, la littérature [23] relate que la proportion des tours augmente de 5% lors de l'association de la protéine à la phosphorylcholine, alors que nous observons plutôt une augmentation (5%) de la proportion des

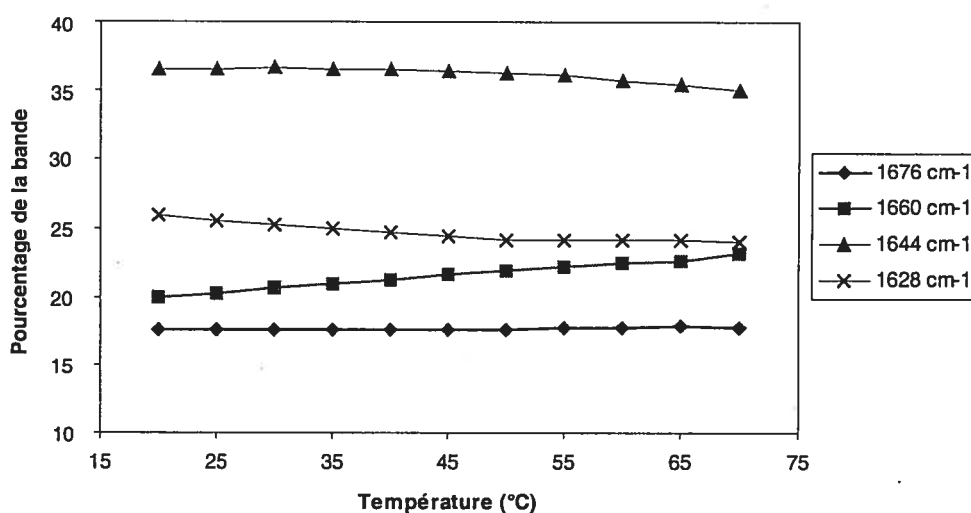
feuilletés  $\beta$  lors de l'association des protéines BSP à des vésicules de DMPC. D'autres travaux en cristallographie rayons X [16] et de dichroïsme circulaire [23] indiquent aussi que l'association des protéines à de la phosphatidylcholine ne provoque que de légers changements de la structure secondaire des protéines BSP.

Lors du chauffage en présence de lipides, la bande Amide I ne subit pas les mêmes changements que lorsque la protéine est seule en solution; le spectre montre en fait peu de modifications. La composante dans les environs de  $1660\text{ cm}^{-1}$  semble croître, mais de façon moins importante que pour la protéine libre. Le maximum de la bande n'est pas déplacé vers les plus hautes fréquences et on n'observe pas de diminution d'intensité vers  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Ceci montre que les phospholipides augmentent la stabilité thermique de ces protéines. De plus, ces résultats indiquent que la protéine est bien associée à la membrane, et que cette interaction influence le comportement des BSP en fonction de la température. On peut observer que les intensités des composantes à  $1660$  et  $1628\text{ cm}^{-1}$  sont peu modifiées par l'augmentation de la température (Tableau V), par opposition aux protéines BSP libres en solution. Il est aussi intéressant de remarquer que le passage de la phase gel à la phase liquide cristalline des lipides (à  $23\text{ }^\circ\text{C}$  pour DMPC) ne semble pas affecter la structure secondaire de la protéine, ce qui est en accord avec la littérature [23].

Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Attribution	Aire à $20^\circ\text{C}$ ( $\pm 2\%$ )	Aire à $70^\circ\text{C}$ ( $\pm 2\%$ )
1676	Tours	18	18
1660	Hélices $\alpha$ , boucles protégées du solvant	20	23
1644	Segments désordonnés, boucles exposées au solvant	36	35
1628	Feuillets $\beta$	26	24

**Tableau VI :** Attribution de chacune des composantes spectrales simulées en présence de DMPC et leurs pourcentages respectifs à  $20$  et  $70\text{ }^\circ\text{C}$ .

La composante vers  $1660\text{ cm}^{-1}$  augmente de 3%, alors qu'elle augmente de 6% lorsque les lipides sont absents. De la même façon, celle vers  $1630\text{ cm}^{-1}$  diminue de 2% alors qu'elle baissait de 5% sans DMPC. On peut donc proposer que la membrane lipidique stabilise la structure secondaire des protéines BSP lorsque celles-ci y sont liées et que les modifications de structure en fonction de la température sont très réduites par la présence de lipides.

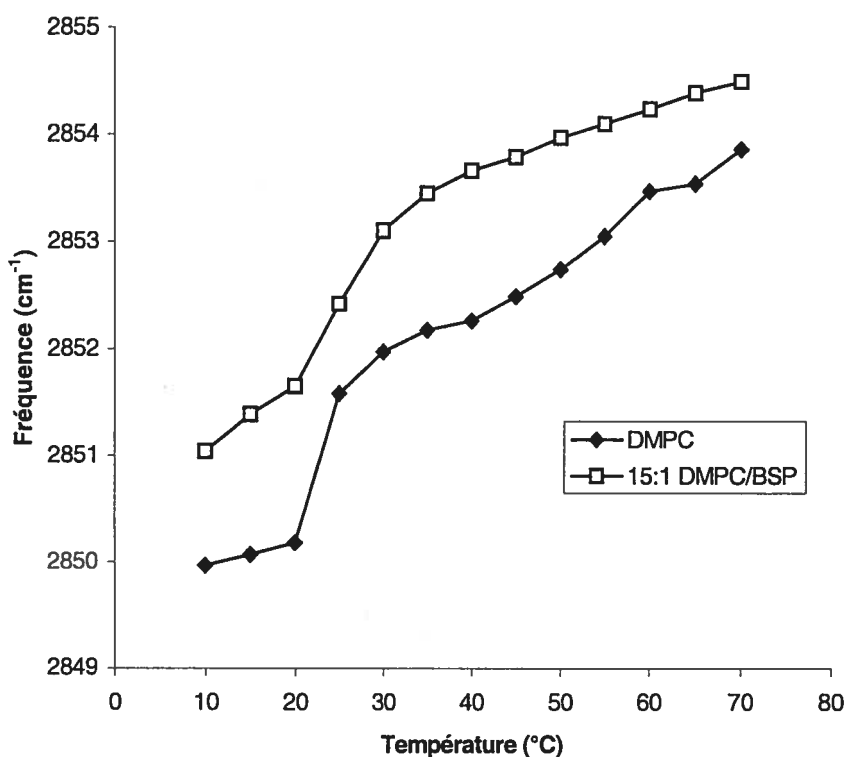


**Figure 3.6 :** Évolution des pourcentages respectifs des composantes spectrales simulées de la bande Amide I' des composantes spectrales simulées en fonction de la température, en présence de DMPC.

La littérature [26] mentionne qu'en présence de DMPC, la température de dénaturation de la protéine passe de 55 à 76 °C. Ces conclusions sont également en accord avec nos résultats en spectroscopie infrarouge à une et deux dimensions présentés dans ce travail. De plus, la simulation de bandes montre que l'association de la protéine à une membrane lipidique ne change pas sa structure native de façon significative. Cette structure semble demeurer stable à plus haute température lorsque la protéine est liée à la membrane lipidique.

### 3.3.3 Effet des protéines BSP sur la transition de phase des lipides

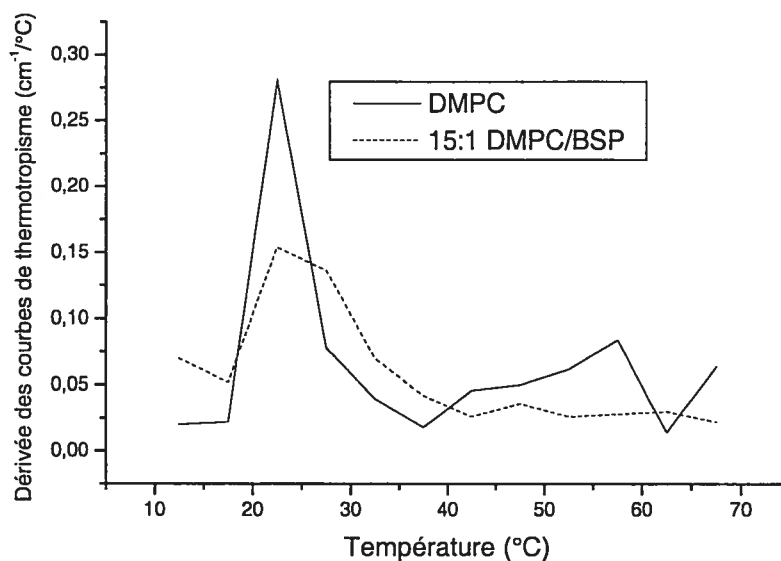
La figure 3.7 reporte la fréquence de l'élongation C-H symétrique en fonction de la température, pour de la DMPC en absence et en présence (15:1 DMPC/BSP) de protéines BSP.



**Figure 3.7 :** Courbes de thermotropisme de vésicules de DMPC en absence et en présence de protéines BSP.

La courbe de thermotropisme de DMPC pure montre un comportement caractéristique d'une transition de la phase gel à la phase liquide cristalline. La fréquence de l'élongation C-H symétrique ( $\nu_{CH}$ ) augmente brusquement à la température de transition de phase (23  $^{\circ}C$  pour DMPC). Les fréquences passent de 2850 (gel) à 2854  $cm^{-1}$  (liquide cristalline), ce qui est caractéristique de la DMPC [53]. Cette augmentation est causée par l'augmentation de conformères gauches dans la chaîne acyle, et par la perte du couplage inter-chaînes [53]. Pour vérifier si les protéines BSP ont une

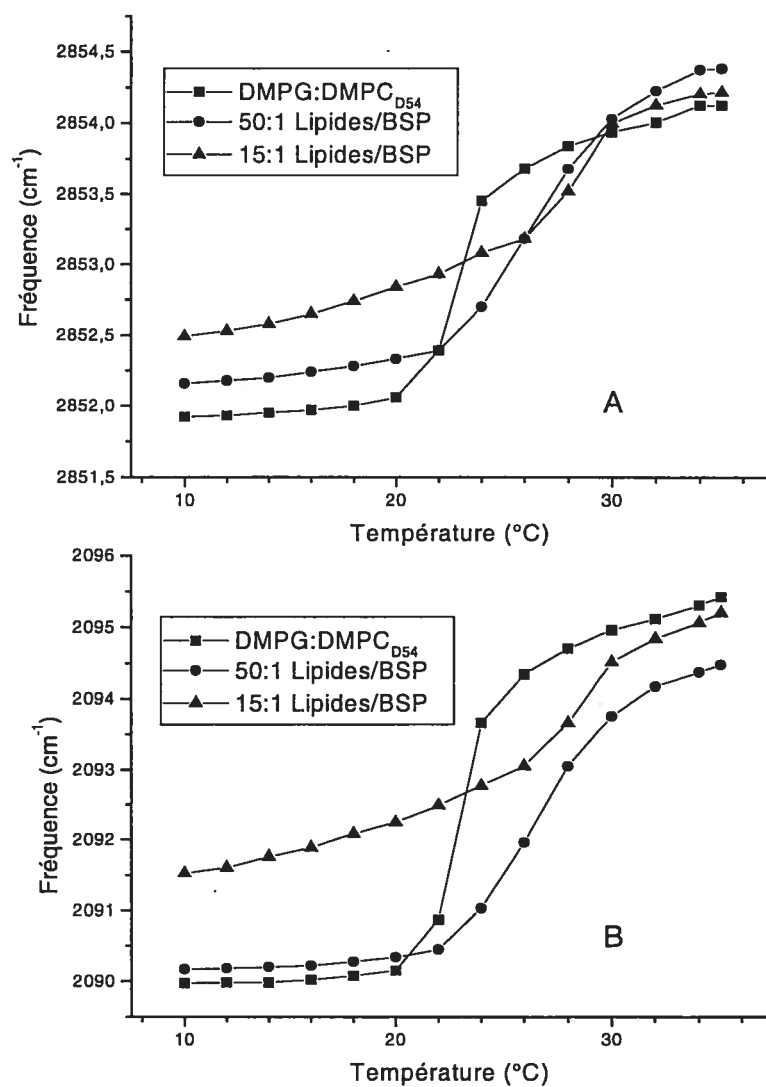
influence sur le thermotropisme des membranes de DMPC, elles ont été ajoutées aux lipides dans un rapport de 15 :1 DMPC/BSP. On observe que la présence de la protéine cause une augmentation des fréquences d'élongation C-H des chaînes acyle des phospholipides dans la phase gel et dans la phase liquide cristalline. Cette augmentation peut être causée par l'augmentation des conformères gauche dans la membrane et/ou par la diminution du couplage inter-chaînes [68]. Il est toutefois impossible de distinguer ces deux effets. La détermination de la position des bandes d'élongation C-H a été faite sur les spectres corrigés pour la contribution de l'eau. Au rapport molaire utilisé dans ce travail, la correction pour la contribution de la protéine modifie la fréquence de  $\nu_{CH}$  de 0,05 à 0,1  $\text{cm}^{-1}$ . La transition de phase en présence de protéines BSP est moins abrupte. La dérivée des courbes de thermotropisme (figure 3.8) montre que la présence de la protéine ne modifie pas de manière considérable la température de transition de phase, en accord avec la littérature [26]. Malgré de légères différences au niveau des valeurs absolues des fréquences, nos travaux et ceux de Gasset et coll. [26] rapportent une augmentation des fréquences dans les deux phases lipidiques de DMPC et une réduction de l'amplitude du changement de fréquence. De plus, des études antérieures en DSC montrent que la présence de protéines BSP sur des vésicules de DMPC diminue l'enthalpie associée à la transition de phase des lipides [26]. Ceci suggère que les chaînes acyles subissent un moins grand changement d'ordre en présence des protéines, en accord avec la diminution de l'amplitude du changement de fréquences des élongations C-H lorsque les protéines BSP sont présentes dans le mélange. Cependant, la transition s'étend sur une gamme de températures un peu plus large.



**Figure 3.8 :** Dérivées des courbes de thermotropisme de DMPC (—) et du mélange 15 :1 DMPC/BSP (- - -).

L'effet des protéines BSP sur des membranes contenant du DMPC, un lipide chargé négativement, a également été étudié. La composition de ces membranes était 7:3 DMPC<sub>D54</sub>:DMPC, en mole. Les rapports lipides/protéine 50:1 et 15:1 ont été investigués.

Dans le mélange DMPC<sub>D54</sub>:DMPC, l'élongation C-H (qui représente spécifiquement le comportement du DMPC) et l'élongation C-D (qui représente le comportement de la DMPC<sub>D54</sub>) montrent une seule transition de phase. Cette transition se produit à la même température (23 °C) pour les deux lipides du mélange, suggérant un mélange homogène, en accord avec la littérature [69]. On peut également observer une augmentation de la fréquence des élongations C-H de DMPC par rapport à celle observée dans les bicouches de DMPC pures. Celle-ci est probablement causée par la dilution isotopique qui brise le couplage inter-chaînes [56].



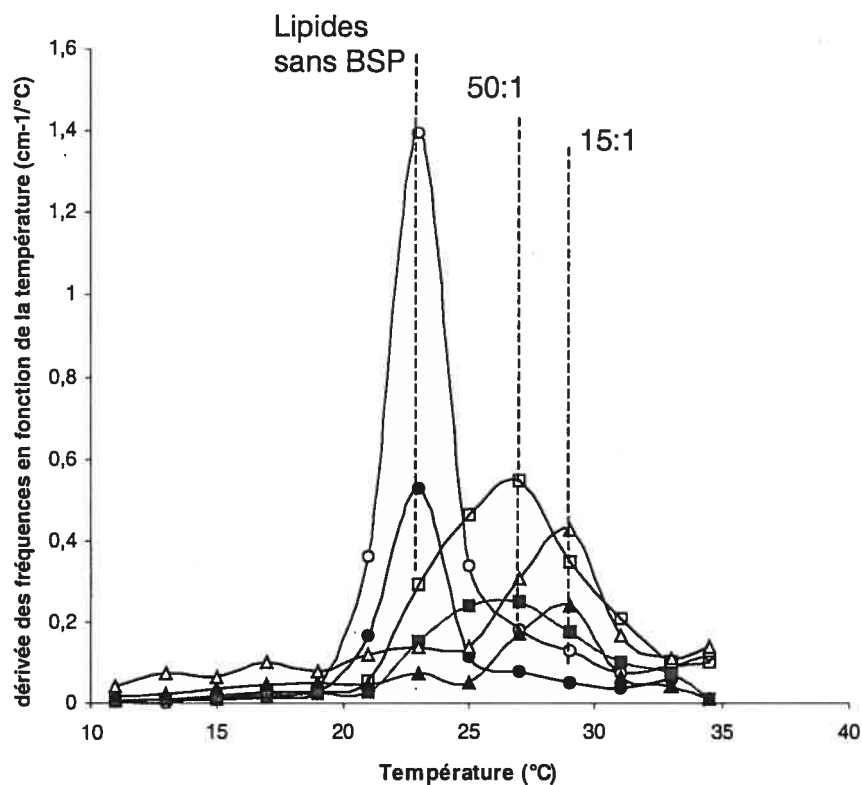
**Figure 3.9 :** Courbes de thermotropisme A) décrivant le DMPG avec  $\nu_{CH}$  et B) pour la DMPC<sub>D54</sub> avec  $\nu_{CD}$  dans un mélange DMPC<sub>D54</sub>:DMPG (7:3), à différents rapports lipides/protéine BSP.



Les protéines BSP ajoutées au mélange causent l'augmentation de la fréquence des élongations C-H et C-D des chaînes acyles des lipides dans la phase gel. Cette augmentation est plus importante lorsque la proportion de BSP est plus élevée dans le mélange. Ce comportement est similaire à celui rapporté pour les BSP et la DMPC seule [26] dans la phase gel. Ceci indique que la protéine induit un plus grand désordre conformationnel et/ou, en s'insérant, brise le couplage inter-chaînes. Dans la phase liquide cristalline, on observe peu d'effet sur les fréquences des élongations C-H et C-D et les petits déplacements ne dépendent pas d'une manière simple de la proportion de protéine. Des expériences en résonance paramagnétique électronique [19] indiquent que le PG dans des membranes en phase liquide cristalline de PC voit sa mobilité réduite lorsque les protéines BSP sont présentes dans le mélange. Nos résultats en spectroscopie infrarouge ne montrent pas l'augmentation d'ordre conformationnel attendue en conséquence de cet effet. Il faut toutefois mentionner que la valeur absolue de la fréquence des élongations C-H et C-D ne dépend pas uniquement de l'ordre conformationnel des chaînes acyles, mais également du couplage inter-chaînes [56] et l'effet combiné de ces facteurs peut être responsable des variations que nous observons. Les variations que nous observons pour le mélange DMPC<sub>D54</sub>:DMPG sont différentes de celles rapportées plus haut pour DMPC pure et pour DMPC<sub>D54</sub> à partir des des élongations C-D [26]. Cette différence suggère une différence au niveau de l'association de la protéine lors de son association avec ces couches de différente composition.

En présence de DMPG, la température de transition de phase des lipides est déplacée vers les plus hautes températures en présence de protéines BSP (figure 3.10). La température de transition de phase passe de 23 °C (lipides seuls) à 27 °C pour le mélange 50:1 lipides/BSP, puis à 29 °C pour le mélange 15:1 lipides/BSP. Donc, cet effet est plus marqué lorsque la quantité de protéines BSP augmente. Ce phénomène est observé pour les élongations C-H et C-D. Il ne semble donc pas avoir de spécificité lipidique dans les interactions lipides-protéines. Ce phénomène n'est pas observé avec les protéines BSP interagissant avec des membranes de PC. Donc, on peut suggérer que la présence d'une charge négative dans la membrane

modifie la façon avec laquelle les protéines BSP interagissent avec les phospholipides, tel que suggéré plus haut à partir des déplacements des bandes d'élongation méthylène.



**Figure 3.10 :** Dérivée des courbes de thermotropisme des phospholipides à différents rapports lipides/BSP. Les symboles pleins représentent les élongations C-H de DMPG, les symboles vides les élongations C-D de DMPC<sub>D54</sub>. (●○) : Lipides seuls, lipides/BSP : (◻◻) 50:1 et (▲Δ) : 15:1.

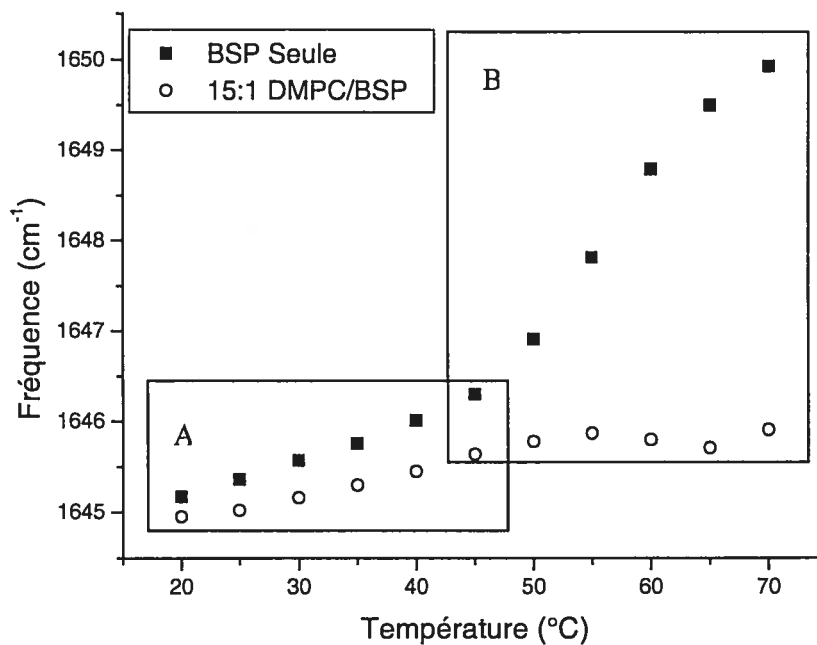
L'augmentation de la température de transition de phase des deux lipides peut être causée par plusieurs phénomènes. La protéine BSP à la surface des vésicules pourrait causer une stabilisation de tous lipides de la membrane par les interactions électrostatiques. En effet, d'autres auteurs [70] ont déjà proposé que des charges positives sur un polypeptide, la polylysine dans leur cas, peuvent neutraliser les charges négatives à la

surface de la membrane et favoriser l'empilement des lipides, stabilisant ainsi la phase gel de la membrane. Les protéines BSP contiennent des résidus chargés positivement qui peuvent neutraliser les charges négatives de DMPG, et alors stabiliser la phase gel des lipides. L'insertion différente de la protéine dans la membrane en présence de DMPG (orientation, profondeur, etc) pourrait aussi expliquer la hausse de la température de transition de phase des lipides. La littérature [71, 72] relate que la longueur du segment hydrophobe de la protéine qui s'insère dans la partie lipidique peut influencer la température de transition de phase. Il est possible que l'insertion des protéines BSP dans la matrice DMPC:DMPG conduit à un segment hydrophobe relativement long dans la membrane, ce qui induirait une augmentation de la température de transition de phase [71]. Des expériences additionnelles sont requises pour élucider l'origine de cette observation originale.

#### 3.3.4 Spectroscopie infrarouge à deux dimensions

La variation de la position du maximum de la bande en fonction de la température est montrée à la figure 3.11.

La variation de fréquence est modeste et relativement linéaire entre 20 et 45 °C. Ensuite, le changement devient plus abrupt entre 45 et 60 °C. Ceci a été interprété comme étant une dénaturation thermique des protéines BSP. Ce changement de structure provoqué par l'augmentation de la température a déjà été observé par dichroïsme circulaire (CD), et détecté par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) [23]. La présence de DMPC ne mène pas à un effet considérable sur la bande Amide I' des protéines BSP aux basses températures (voir figure 3.5). Si on chauffe jusqu'à 70 °C, la bande montre seulement quelques variations (voir figures 3.5 et 3.11), toujours en accord avec la littérature [23].



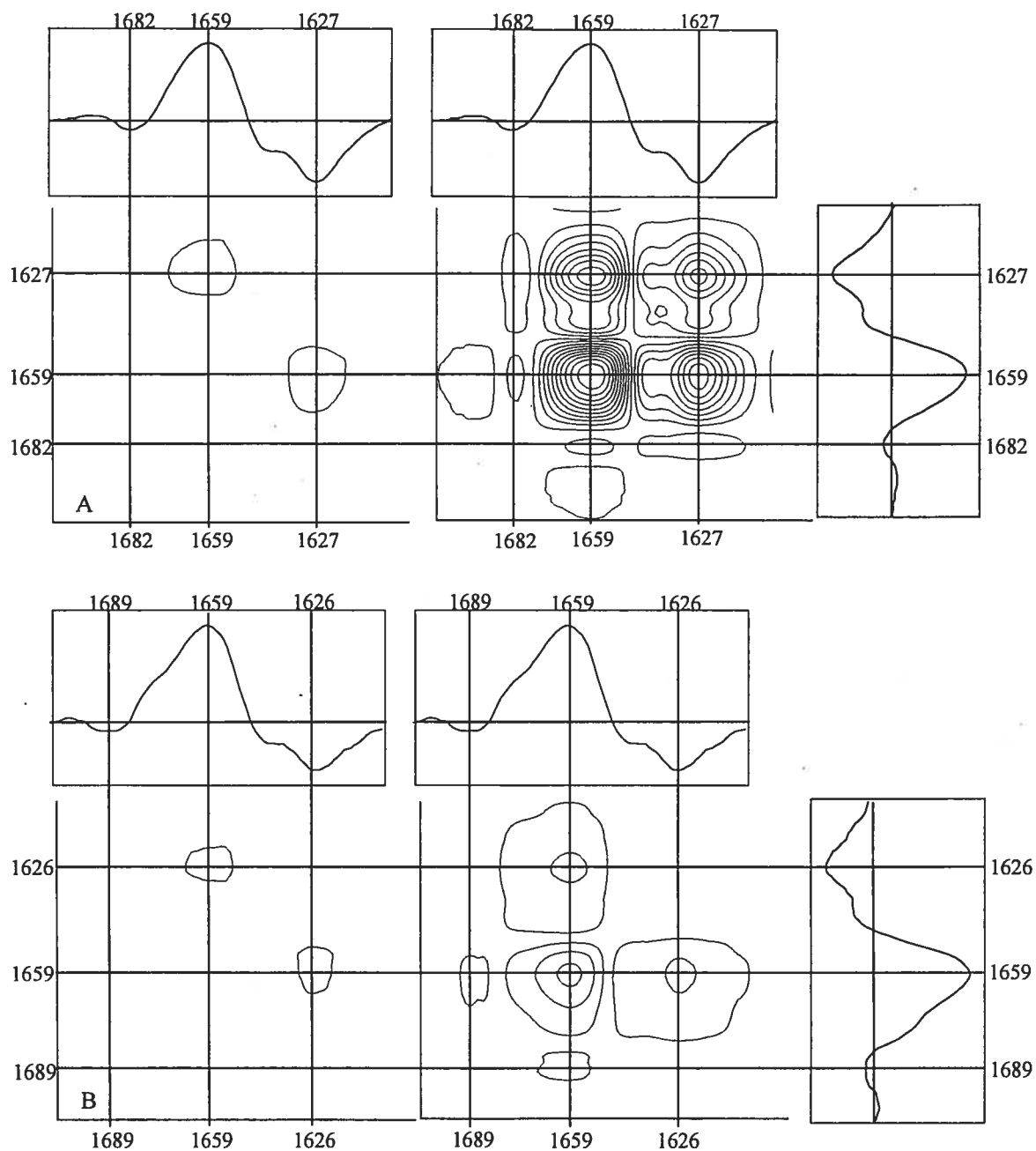
**Figure 3.11** : Évolution du maximum de la bande Amide I' en fonction de la température. Les domaines A et B ont été définis pour l'analyse infrarouge 2D.

Le passage de la phase gel à la phase liquide cristalline de DMPC ( $T = 23$  °C) ne semble pas affecter la structure secondaire des protéines, puisque aucun changement significatif ne peut être observé à cette température. Le fait que la bande Amide I' ne subisse que très peu de changements lors du chauffage lorsque DMPC est présente montre que la protéine est associée à la membrane lipidique, et que cette interaction amène une stabilisation de la structure de la protéine.

Dans le but d'obtenir plus de détails sur les changements de structures de BSP causés par l'augmentation de la température, nous avons examiné les spectres obtenus à l'aide de la spectroscopie infrarouge à deux dimensions. Deux intervalles de températures ont été définis, en se basant sur la variation du maximum de la bande Amide I' des protéines BSP seules en solution (voir figure 3.11). Le premier intervalle a été défini entre 20 et 45 °C, où le maximum de la bande suit un déplacement graduel et limité à  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Cet

intervalle inclut la transition gel-cristal liquide des lipides. Le second intervalle a été défini entre 45 et 70°C, où le maximum de la bande est déplacé de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Les cartes synchrones de spectroscopie infrarouge 2D de la protéine BSP seule dans le tampon MOPS deutéré peuvent être observées à la figure 3.12 A. L'évolution de la bande Amide I' entre 25 et 45 °C (image de gauche), et entre 45 et 70 °C (image de droite) est montrée. On peut déduire de cette figure que la bande Amide I' subit ses changements majoritairement aux températures plus élevées. Ces changements consistent en une augmentation de la composante à 1659  $\text{cm}^{-1}$ , en concomitance avec la décroissance de celles à 1627 et 1682  $\text{cm}^{-1}$ , indiquée par la présence de pics croisés négatifs.



**Figure 3.12 :** Cartes synchrones (IR à 2 dimensions) de la bande Amide l' des protéines BSP A) seules en solution et B) dans un ratio molaire 15:1 DMPC/BSP. La partie de gauche montre l'évolution entre 25 et 45°C, celle de droite entre 45 et 70°C. Les spectres au haut et sur le côté de la figure sont les spectres de différences moyens de la série de spectres enregistrés en fonction de la température. Toutes les échelles sont en cm<sup>-1</sup>.

Ces changements montrés par la spectroscopie infrarouge à 2 dimensions sont en accord avec les résultats en IR à 1 dimension, obtenus par décomposition et déconvolution de bandes, publiés précédemment [23, 26]. Ces changements sont interprétés comme étant une perte de feuillets  $\beta$  au profit du gain d'hélices  $\alpha$  et de tours protégés du solvant [23]. Les cartes asynchrones (non illustrées) n'ont pas montré de corrélations significatives, indiquant que les modifications de la bande Amide I' se produisent en même temps (de façon synchronisée) lors de l'augmentation de la température. La figure 3.12 B montre les cartes synchrones associées à la variation de la bande Amide I' des protéines BSP dans un échantillon ayant un ratio molaire de 15:1 DMPC/BSP. Les cartes illustrent les variations plus limitées lorsque la protéine est liée à une membrane lipidique, en comparaison avec BSP seules en solution, surtout pour l'intervalle de température entre 45 et 70 °C. Il est toutefois noté que les changements, même s'ils sont moins prononcés, se produisent à des positions très similaires sur la bande. Ces changements pourraient être associés à une petite fraction de protéines non liées qui subiraient les changements de structure en augmentant la température.

### 3.4 Conclusions

#### 3.4.1 Spectroscopie infrarouge à une dimension

Les interactions entre les protéines BSP et les membranes chargées n'ont pas été étudiées extensivement. Les résultats préliminaires présentés ici indiquent que les lipides chargés peuvent moduler l'interaction de ces protéines avec les membranes. Plusieurs études suggèrent toutes que la présence d'une charge négative dans la membrane provoque une diminution de l'affinité des protéines avec les membranes chargées [19-21]. Il serait donc intéressant, dans des projets futurs, d'investiguer plus en profondeur le comportement des protéines BSP en présence de différentes charges, entre autres par ITC, FTIR et RMN. Ces études pourraient élucider pourquoi nous observons des différences dans le thermotropisme des lipides en présence d'une charge négative.

Dans ce chapitre, il a été montré que l'évolution de la structure secondaire des protéines BSP en fonction de la température est modifiée par la présence de phospholipides. Premièrement, l'association des protéines BSP à une membrane lipidique ne semble pas induire de changement important de leur structure secondaire par rapport à celle qu'elles adoptent en solution. De plus, l'association des protéines à une membrane lipidique modifie la température de dénaturation des BSP, la faisant passer de 55 à 76°C. On peut suggérer que la structure secondaire des protéines est stabilisée lors de cette interaction. Ceci indique que l'association entre les protéines BSP et les membranes lipidiques se produit, et que nos interprétations des expériences en ITC sont bien attribuées aux interactions entre les protéines et les membranes modèles. Deuxièmement, la protéine ne modifie à toute fin pratique pas la transition de la phase gel à la phase liquide cristalline de DMPC. Cependant, en présence de lipides chargés négativement, la température de transition de phase gel-cristal liquide augmente avec la concentration de protéines. DMPC et DMPG dans les mélanges sont affectés de la même manière par la protéine, suggérant l'absence de séparation de phase.

#### 3.4.2 Spectroscopie Infrarouge à deux dimensions

La dénaturation thermique des protéines BSP a également été investiguée à l'aide de la spectroscopie infrarouge à deux dimensions. La dénaturation a été observée autour de 55 °C, en accord avec la littérature [23]. Lorsque les protéines BSP étaient liées à DMPC, les cartes IR-2D ont montré les mêmes changements de bande, seulement d'amplitude beaucoup plus limitée. Les cartes à pleine échelle (non illustrées) en présence de DMPC ont montrées un changement progressif et non coopératif de la bande Amide I'. La dénaturation thermique des protéines BSP se produit à plus haute température lorsqu'elles sont liées à DMPC, ce qui indique que la protéine est stabilisée par cette interaction.



## Chapitre 4

### Interactions entre les protéines BSP et LDL

#### 4.1 Introduction

Comme mentionné dans le chapitre 1, le jaune d'œuf a été extensivement utilisé dans les 60 dernières années pour conserver le sperme bovin [30]. Il a été remarqué que le fait de diluer la semence dans du jaune d'œuf l'empêche de se détériorer pendant le stockage sur de longues périodes et semble également la prévenir contre les effets dévastateurs de la cryopréservation. Toutefois, malgré l'efficacité indiscutable de cette pratique, les phénomènes moléculaires qui provoquent cette préservation ne sont pas encore bien expliqués.

Le mode d'action du jaune d'œuf semble passer par les interactions d'une de ses composantes, les lipoprotéines de faible densité (LDL pour low-density lipoproteins), avec les composantes du sperme bovin. Des études ont montré que les lipoprotéines du jaune d'œuf s'associent avec les membranes des spermatozoïdes. Cette association pourrait concurrencer avec celle avec les protéines BSP et expliquer l'effet protecteur du jaune d'œuf sur les semences congelées. Toutefois, la littérature relate des contradictions quant à la stabilité de cette association [73-75]. L'équipe du docteur Manjunath a, de son côté, démontré que les LDL se lient aux protéines BSP présentes dans le liquide séminal bovin [30]. Il est connu que les protéines BSP interagissent avec les membranes des spermatozoïdes, et que cette association résulte en une capacitation des cellules reproductrices [6, 9, 76, 77]. L'interaction entre les protéines BSP et LDL pourrait ainsi retarder la capacitation des spermatozoïdes par les protéines BSP. L'effet protecteur du jaune d'œuf pourrait donc se traduire par une combinaison de 2 phénomènes : l'association protéine BSP-membrane, et l'interaction protéine BSP-LDL. Une toute première interrogation à poser est de savoir si les LDL interagissent avec les protéines BSP, ou avec les lipides de la membrane

des spermatozoïdes. Cette question est investiguée par titrage calorimétrique isotherme, et les résultats et observations sont présentés dans ce chapitre.

#### *4.2 Matériel et méthodes*

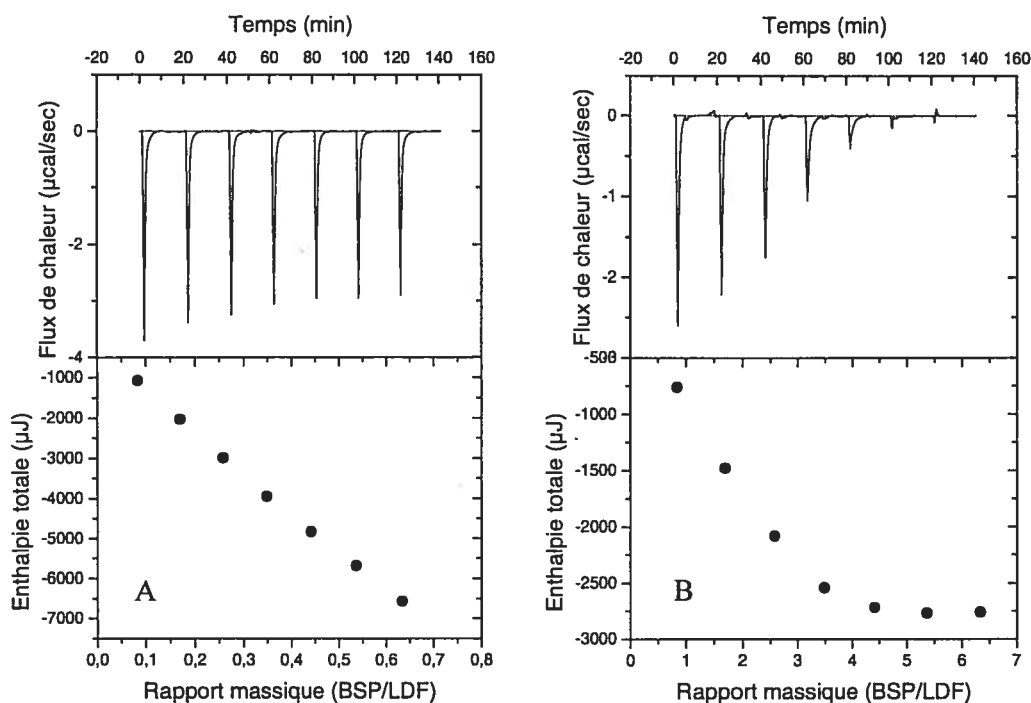
Les protéines BSP ont été purifiées dans le laboratoire du docteur Manjunath, selon la procédure déjà publiée [1, 2]. Les lipoprotéines du jaune d'œuf (LDL) proviennent du même laboratoire, et purifiés selon la méthode décrite dans la littérature [30]. Le tampon Tris (tris(hydroxyméthyl)aminoéthane) a été acheté chez Sigma (St-Louis, MO).

Pour les expériences ITC, les LDL ont été suspendues dans le tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7.4) à une concentration de 0.1 ou 1.0 mg/ml. Les protéines BSP ont été dissoutes dans le même tampon à une concentration de 0.2 mM. Des volumes de 40  $\mu$ l de solution de BSP ont été injectés dans la suspension de LDL placée dans la cellule, à une température de 37 °C. Puisque les LDL sont des molécules assez instables, les suspensions n'ont pas été soumises au vortex, ni dégazées.

Des résultats reproductibles ont été obtenus avec des LDL isolées depuis moins de trois semaines. Au-delà de cette période, les thermogrammes ont montré des résultats différents et non reproductibles. Les LDL sont des assemblages assez instables et leur conservation au-delà de 3 semaines est en fait problématique.

### 4.3 Résultats

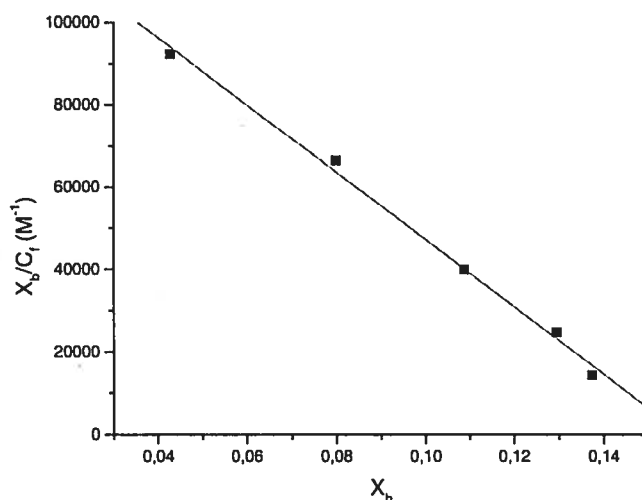
La figure 4.1 montre les résultats ITC pour le titrage de deux solutions de LDL de concentrations différentes avec une solution de protéines BSP, à une température de 37 °C.



**Figure 4.1 :** Titrages calorimétriques isothermes de suspensions de LDL A) 1 mg/ml et B) 0.1 mg/ml avec une solution de protéines BSP (0.2 mM) à 37 °C.

On peut observer sur ces courbes de titrage à 37 °C que les interactions entre BSP et LDL conduisent à un phénomène exothermique, comme dans le cas des interactions entre BSP et des vésicules lipidiques de différentes compositions (chapitre 2). La figure 4.1 A) montre une faible variation de l'aire des pics lors du titrage, indiquant que vraisemblablement, dans ces conditions, nous sommes en présence d'un excès de LDL par rapport aux protéines BSP et qu'à chaque injection, pratiquement toutes les protéines BSP injectées se lient aux LDL. Si on considère une association complète, on obtient un  $\Delta H_{\text{mol}}$  d'association est de  $-104 \pm 34$  kJ/mol de protéines BSP

( $n = 4$ ). Cette valeur est dans le même ordre de grandeur que celles observées lors des interactions protéine BSP-lipides pour lesquelles le  $\Delta H_{\text{mol}}$  variait de -47 à -106 kJ/mol. Ceci pourrait indiquer que les protéines BSP se lient à la partie lipidique des LDL. La figure 4.1 B) montre une diminution progressive des aires des pics, jusqu'à l'obtention de signaux très faibles lors des deux dernières injections. Ce type de courbe de titrage est caractéristique d'un titrage complet. On peut donc conclure que la saturation est atteinte dans ces conditions, à un rapport massique de 5,3 mg de protéine BSP/mg de LDL. Ce rapport est compatible avec le ratio d'association maximal calculé par l'équipe du docteur Manjunath, qui propose une valeur entre 5 et 7,5 mg BSP/mg LDL [30].



**Figure 4.2 :** Graphique de Scatchard pour le titrage de LDL (0,1 mg/ml) par une solution de protéines BSP (3 mg/ml). Les points représentent les données expérimentales, et le trait la simulation des données.

Les données du titrage complet ont été traitées selon la méthode de Scatchard (figure 4.2), à partir des variations d'enthalpie mesurées lors du titrage, du  $\Delta H_{\text{mol}}$  déterminé et en faisant les mêmes hypothèses quant à l'association exclusivement avec la fraction lipidique des LDL, d'une masse molaire moyenne estimée à 787 g/mol. Le nombre de moles de lipides dans

la cellule a été calculé en considérant que la partie lipidique de LDL (89% du poids total de LDL) est constituée d'environ 27% de phospholipides (masse molaire estimée à 750 g/mol), de 69% de triglycérides (masse molaire estimée à 825 g/mol) et de 4% de cholestérol (masse molaire de 387 g/mol). La constante d'association ( $K$ ) est de  $820 \pm 30 \text{ mM}^{-1}$  et un site d'association serait composé de  $6.3 \pm 0.2$  lipides. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues lors de l'association des protéines BSP à des membranes lipidiques modèles (chapitre 2). Ceci appuie l'hypothèse que les protéines BSP se lient à la partie lipidique de LDL [30].

L'injection d'une suspension de LDL (1 mg/ml) dans une suspension de vésicules de POPC (5 mM) (7 injections de 40  $\mu\text{L}$ , non illustré) montre que l'addition de LDL à des vésicules lipidiques n'implique que très peu d'énergie. En fait, aucune variation significative de la capacité calorifique relative n'est observée lors des injections, suggérant que les vésicules de POPC n'interagissent pas avec LDL.

#### 4.4 *Discussion et conclusion*

L'allure du titrage, à 37 °C, de LDL par les protéines BSP est très similaire à ceux des lipides étudiés dans le chapitre 2 de ce travail; les signaux sont exothermiques et l'enthalpie molaire d'association est dans le même ordre de grandeur ( $-104 \pm 34 \text{ kJ/mol}$ ). On peut donc supposer que le transfert des protéines BSP de la solution aux LDL s'apparente au transfert des protéines dans les bicouches lipidiques modèles (chapitre 2). Les LDL se présentent sous la forme de micelles en solution, de taille variant de 17 à 60 nm [78]. Le centre de ces micelles serait constitué majoritairement de triglycérides et de triacylglycérols, alors que l'extérieur de ces micelles serait surtout fait de phospholipides, de cholestérol et de la partie protéique de LDL [78]. Les LDL fournissent donc un milieu amphiphile propice à l'association des protéines BSP. On y retrouve un coeur hydrophobe et une interface avec des têtes polaires de phospholipides, dont 50 à 70% portent la tête choline. Sur la base de nos modèles, les résultats suggèrent alors que les protéines BSP

interagissent avec la partie lipidique des LDL, et que LDL n'interagit pas avec les membranes des spermatozoïdes. Cette association serait à l'origine de l'effet protecteur des LDL, tel que suggéré dans la littérature [30].

## Chapitre 5

### Conclusions

Le but de ce travail était d'investiguer les interactions entre les protéines du liquide séminal bovin et les membranes lipidiques modèles par titrage calorimétrique isotherme (ITC) ainsi que par spectroscopie infrarouge (FTIR). Ces protéines avaient déjà été caractérisées en termes de structure primaire, de structure secondaire et de poids moléculaire [1-3, 11-14]. De plus, les protéines BSP semblaient avoir une certaine affinité pour la partie choline des lipides [18]. Nous voulions donc déterminer la spécificité des protéines BSP pour différents lipides. Aussi, l'analyse des données ITC permet de déterminer des coefficients de partage entre les protéines en solution et les protéines qui sont liées aux membranes. Dans les études RPE, la spécificité lipidique est établie en incorporant à une matrice lipidique de phosphocholine une faible quantité de lipide marqué (1%). Dans l'étude SPR, il y a toujours une grande quantité de cholestérol. Aucune étude à ce jour n'examine l'effet des propriétés des membranes modulées par la composition en phospholipides. Notre étude apporte donc ce nouvel aspect. De plus, l'effet de la température sur les interactions entre les protéines BSP et les membranes lipidiques ont été très peu caractérisées. Nous voyions donc une occasion d'approfondir les connaissances sur ce système.

Nos résultats obtenus à l'aide de la technique ITC, et présentés dans le chapitre 2, montrent d'abord que les protéines BSP interagissent avec les membranes lipidiques modèles choisies. Ces données ont été interprétées à l'aide de deux modèles théoriques.

Les deux modèles choisis ont suggéré que l'affinité des protéines BSP était plus grande pour des membranes de POPC qui contenaient 30% de POPE. La présence de POPE entraîne aussi un haut ratio d'association (27 lipides / protéine), montrant que la saturation de la membrane est plus rapidement atteinte. Les conclusions rapportées à l'aide de la résonance paramagnétique électronique [27] montrent que la protéine interagit

préférentiellement avec PC, par rapport à PE. Il semble donc que la protéine induit un enrichissement ou une séparation de phase. La création de cette séparation de phase peut être à l'origine de la diminution d'affinité que ces auteurs rapportent ainsi que du haut ratio lipide/protéine que nous trouvons. Notre étude serait donc la première à mettre en évidence l'effet de la composition lipidique sur l'association des protéines BSP aux membranes, puisque nous avons utilisé une matrice de POPC pure en faisant varier la composition d'un seul lipide à la fois.

La présence de cholestérol dans les membranes de PC a également été investiguée, entre autres parce que les protéines BSP sont connues pour causer l'efflux de particules lipidiques contenant du cholestérol [5, 6]. Il est également reporté que les protéines BSP n'interagissent pas directement avec le cholestérol [7, 28, 66]. L'affinité des protéines BSP pour les membranes contenant du cholestérol a été la plus faible mesurée par ITC lors de notre travail. Nous avons suggéré que ce faible coefficient de partage était attribuable au fait que les molécules de cholestérol rigidifient les membranes lipidiques [63]. De plus, elles sont connues pour provoquer la formation de domaines lipidiques [64]. Nous avons donc suggéré qu'une membrane rigide et des domaines riches en cholestérol ne favorisaient pas l'insertion des protéines BSP. Il est mentionné dans la littérature que la présence de cholestérol favorise l'interaction entre les protéines BSP et les membranes lipidiques [29], ce qui est contraire à nos conclusions. Rappelons que les auteurs cités suggèrent une plus grande affinité des protéines BSP en présence de cholestérol non pas par une constante d'affinité plus élevée, mais seulement en mentionnant que le stérol fait augmenter le nombre de sites d'association sur une protéine BSP, excluant même un changement de stoechiométrie de l'interaction. Notre travail indique que le nombre de lipides / protéine BSP change en fonction de la composition lipidique des membranes, ce qui est différent de ce qui est publié. Aussi, malgré le changement du ratio d'association lipides / BSP, nous n'avons pas suggéré un changement du nombre de sites d'association de lipides sur la protéine, puisqu'il est clairement indiqué dans la littérature qu'une protéine BSP comprend deux sites d'association, apparentés aux domaines de type II de la



fibronectine [3, 11-16]. À partir des nombres de lipides par site déterminés, nous voyons donc que la complexation ne peut pas être simplement expliquée par l'insertion de 2 PC dans ces sites spécifiques. De plus, la stoechiométrie des lipides extraits par rapport à la quantité de protéine BSP est très différente de 2. Ces observations renforcent l'idée que les protéines n'interagissent pas par simple reconnaissance avec quelques lipides mais probablement conduisent à la formation d'un complexe comprenant plusieurs molécules pour former un macroassemblage. Dans de telles structures, les propriétés de courbures de la partie lipidique sont importantes et ce mécanisme serait bien compatible avec nos résultats. Par exemple, nos résultats montrent que le coefficient de partage des protéines BSP dans les membranes lipidiques est nettement plus faible lorsque le cholestérol est présent dans nos membranes, donc lorsque la bicouche lipidique est plus rigide. Une autre étude [29] montre que la présence de 5% (p/p) de cholestérol dans des bicouches de DMPC augmente le nombre de PC immobilisés. Cet effet est constant jusqu'à 20% (poids/poids) de cholestérol, la proportion maximale étudiée. Il est possible que chaque protéine immobilise plus de lipides à cause d'une profondeur différente dans les bicouches contenant du cholestérol mais que globalement, moins de protéines se fixent à la bicouche.

L'insertion de POPG chargée dans les membranes nous a permis de définir une charge effective positive pour les protéines BSP lors de l'association avec les lipides, malgré le caractère acide des protéines BSP en solution [65]. Toutefois, d'autres études ont déjà montré des charges effectives de peptides liés qui étaient différentes de leur charge absolue en solution [48, 49]. Les résultats obtenus pour l'affinité ont montré que les interactions entre les protéines BSP et les membranes sont influencées par les interactions électrostatiques. En effet, puisque la charge effective des protéines BSP est positive, la concentration des protéines près de la membrane chargée négativement est nettement plus élevée que dans les autres systèmes étudiés. L'énergie associée au transfert de la protéine, de la phase aqueuse à proximité de la membrane à l'intérieur de la membrane (exprimée aussi par la constante d'affinité interfaciale) est plus négative pour les bicouches de

POPC en absence qu'en présence de POPG. Cependant, si on tient aussi compte des interactions électrostatiques de longue distance, une valeur du même ordre de grandeur que celle obtenue avec POPC seule est obtenue. Cette correction nous a permis de constater que les interactions entre les protéines BSP et les membranes chargées négativement sont principalement causées par les interactions électrostatiques. Ces fortes interactions seraient également responsables de l'enthalpie molaire d'association élevée pour ce système. Finalement, les résultats obtenus par ITC avec ce système nous ont conduits à une étude plus exhaustive de l'association des protéines BSP à des membranes de DMPC/DMPG en spectroscopie infrarouge à une dimension, dont les principales conclusions sont mentionnées plus bas.

Notre travail s'inscrit dans l'avancement de la compréhension du phénomène de la reproduction, plus spécifiquement au niveau du rôle des protéines BSP dans ce phénomène. Nos résultats montrent que les protéines BSP interagissent spécifiquement avec les lipides, ce qui est en accord avec la fonction supposée des protéines BSP, qui serait de réguler la composition des membranes plasmiques lors de la reproduction. Aussi, notre travail fait un lien entre la présence de PE dans les membranes plasmiques de spermatozoïdes [8] et une interaction préférentielle des protéines BSP avec les membranes contenant de la POPE. Cette préférence pourrait justifier la présence de PE dans les membranes naturelles.

La régulation de la composition en lipides des membranes par les protéines BSP semble passer par l'efflux de particules lipidiques qui contiennent de la phosphocholine et du cholestérol [5-7]. Nos résultats montrent que les protéines BSP se lient à des membranes contenant du cholestérol, même si le coefficient de partage est le plus faible de ceux que nous avons calculé. À notre sens, ceci représente une autre preuve de l'implication des protéines BSP dans la régulation des lipides des membranes plasmiques. Cette preuve d'association des protéines BSP à des membranes contenant du cholestérol est également en accord avec des résultats préliminaires obtenus par microscopie électronique cryogénique montrant un effet des protéines BSP

sur la géométrie des vésicules de POPC contenant du cholestérol (résultats non publiés).

Il serait intéressant, dans le futur, d'explorer davantage les interactions entre les protéines BSP et les membranes lipidiques à l'aide d'autres techniques. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) nous semble une technique de choix pour approfondir les connaissances acquises dans cet ouvrage. Premièrement, une étude de la mobilité des chaînes acyles pourrait être réalisée par RMN du deutérium ( $^2\text{H}$ ) en phase solide. En effet, l'importance de l'éclatement quadripolaire des spectres dépend de la mobilité des deutérons attachés aux carbones des chaînes acyles des lipides. Il serait donc intéressant de comparer ces résultats avec ceux déjà obtenus par RPE dans la littérature. Deuxièmement, il serait possible de mesurer la liberté de mouvement des têtes des lipides par RMN du phosphore ( $^{31}\text{P}$ ). Ici, il est possible de calculer un paramètre d'ordre qui dépend de la liberté de mouvement des atomes de phosphore contenus dans les têtes des lipides. Ainsi, nous pourrions avoir un portrait plus global de l'effet de l'association des protéines BSP à des membranes lipidiques, autant au niveau des chaînes acyles (cœur hydrophobe) qu'à la surface des membranes (partie hydrophile).

Puisque nos résultats font état d'une importante contribution des interactions électrostatiques lors des interactions protéines BSP – membranes, il serait intéressant de pousser les études en ce sens. La spectroscopie infrarouge pourrait continuer à fournir des informations intéressantes, entre autres en répétant les expériences rapportées dans cet ouvrage avec un autre lipide chargé négativement (DMPA ou DMPS, par exemple). Des systèmes contenant PA ou PS pourraient également être étudiés par ITC. L'association des protéines BSP à des membranes chargées pourrait également être investigués à l'aide de la microcalorimétrie différentielle à balayage pour corroborer les enthalpies molaires d'association obtenues par ITC. Finalement, ces systèmes chargés pourraient également faire l'objet d'une étude RMN telle que proposée au paragraphe précédent.

Notre étude à l'aide du titrage calorimétrique isotherme nous a permis d'observer un important effet de la température sur l'allure des thermogrammes. Selon la température à laquelle l'expérience est menée, des signaux endothermiques ou exothermiques peuvent être observés. Pour certains systèmes, les deux signaux pouvaient être enregistrés simultanément. La tendance générale de nos résultats semble montrer que les signaux endothermiques deviennent plus importants si la rigidité de la membrane augmente (température plus basse, présence de cholestérol). La littérature rapporte également que les protéines BSP passent d'une forme agrégée à une forme mono-dimère à 36 °C, en augmentant la température [23, 25]. Nous avons suggéré que les signaux endothermiques, prédominants à 20 °C, pourraient être associés à la dissociation des agrégats de protéine lors de l'association à la membrane lipidique. Les signaux exothermiques, prédominants à 37 °C, seraient associés à la partition des protéines BSP sous forme mono-dimère dans la partie lipidique de la membrane. Il est important de mentionner que les signaux endothermiques observés à 10 et 20 °C avec POPC sont en accord avec ce qui avait déjà été publié précédemment [21].

Nous avons étudié le comportement des protéines BSP en fonction de la température à l'aide de la spectroscopie infrarouge à une et à deux dimensions. Nos résultats ont d'abord permis de confirmer ce qui était publié [23, 26]. L'analyse de la bande Amide I' des protéines BSP seules dans MOPS deutéré a permis de détecter une transition à 55 °C, associée à la dénaturation thermique des molécules. Lorsque les protéines BSP sont liées à une membrane de DMPC, cette dénaturation est déplacée à de plus hautes températures (au-dessus de 70 °C). L'association des protéines BSP aux membranes ne modifie pas la température de changement de phase des lipides. Cependant, aucune étude infrarouge publiée n'avait été faite en présence de lipides chargés dans la membrane. L'insertion de DMPG dans une membrane de DMPC<sub>D54</sub> a permis de constater que l'association des protéines BSP à une telle membrane augmente la température de transition des deux lipides à la fois, ce qui n'a jamais été observé auparavant. L'importance de l'augmentation de la température de transition de phase est

proportionnelle à la quantité de protéines BSP dans le mélange. Nous avons proposé que cette stabilisation de la phase gel des lipides lorsqu'une charge négative est présente pourrait être causée par des interactions électrostatiques entre les protéines BSP et les lipides chargés de la membrane.

Les cartes synchrones en spectroscopie infrarouge à deux dimensions ont montré que les changements de la bande Amide I' en fonction de la température, pour les protéines BSP seules en solutions et liées à une membrane de DMPC, sont très semblables mais d'intensités différentes. Ces résultats appuient ceux obtenus en spectroscopie infrarouge à une dimension.

Le quatrième chapitre de cet ouvrage rapporte une brève analyse par ITC des interactions entre les protéines BSP et la partie LDL du jaune d'œuf, qui serait à l'origine de l'efficacité de la cryopréservation des semences bovines [30]. Nos résultats ont montré que les protéines BSP se lient avec les LDL, et que LDL ne semble pas interagir avec des membranes lipidiques modèles. Ces résultats suggèrent que les LDL empêchent la capacitation des spermatozoïdes en se liant aux protéines BSP, et non à la membrane plasmique des cellules reproductrices. L'analyse des thermogrammes obtenus propose une enthalpie molaire d'association qui est du même ordre de grandeur que celles mesurées pour les interactions protéines BSP – membranes modèles, rapportées dans le chapitre 2. De plus, l'analyse des résultats à l'aide d'un graphique de type Scatchard suggère qu'une protéine BSP se lie à environ 6 lipides, ce qui est également du même ordre de grandeur que les ratios de saturation rapportés dans le chapitre 2. Ces conclusions appuient donc la thèse que les protéines BSP se lient à la partie lipidique des LDL [30].

Ce travail représente la première introspection du groupe de recherche du laboratoire de Michel Lafleur dans le sujet des interactions protéines BSP – lipides. À la lumière des résultats obtenus, de nombreuses questions devront

trouver leur réponse dans des études subséquentes, ce pour des années à venir.

## Références

1. Manjunath, P., et Sairam, M. R. (1987) *Biochem. J.* **241**, 685-692.
2. Manjunath, P., Sairam, M. R., et Uma, J. (1987) *Biosci. Rep.* **7**, 231-238.
3. Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y. L., Seidah, N. G., Chrétien, M., & Chapdelaine, A. (1988) *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems* pp 259-273, Plenum Publishing Corp., New-York.
4. Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E., et Desnoyers, L. (1994) *Biol. Reprod.* **50**, 27-37.
5. Moreau, R., Frank, P. G., Perreault, C., Marcel, Y. L., et Manjunath, P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 38-46.
6. Thérien, I. M. R., et Manjunath, P. (1999) *Biol. Reprod.* **61**, 590-598.
7. Moreau, R., et Manjunath, P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 175-184.
8. Nolan, J. P., et Hammerstedt, R. H. (1997) *FASEB J.* **11**, 670-682.
9. Manjunath, P., et Thérien, I. (2002) *J. Reproductive Immun.* **53**, 109-119.
10. Davis, B. K. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7560-7564.
11. Baker, M. E. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 1010-1014.
12. Sticht, H., Pickford, A. R., Potts, J. R., et Campbell, I. D. (1998) *J. Mol. Biol.* **276**, 177-187.
13. Pickford, A. R., Potts, J. R., Bright, J. R., Phan, I., et Campbell, I. D. (1997) *Structure* **5**, 359-370.

14. Constantine, K. L., Madrid, M., Banyai, L., Trexler, M., Patthy, L., et Llinas, M. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 281-298.
15. Desnoyers, L., et Manjunath, P. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 341-349.
16. Wah, D. A., Fernandez-Tornero, C., Sanz, L., Romero, A., et Calvete, J. J. (2002) *Structure* **10**, 505-514.
17. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., et Cullis, P. R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 55-65.
18. Desnoyers, L., et Manjunath, P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10149-10155.
19. Ramakrishnan, M., Anbazhagan, V., Pratap, T. V., Marsh, D., et Swamy, M. J. (2001) *Biophys. J.* **81**, 2215-2225.
20. Müller, P., Erlemann, K. R., Müller, K., Calvete, J. J., Töpfer-Petersen, E., Marienfeld, K., et Herrmann, A. (1998) *Eur. Biophys. J.* **27**, 33-41.
21. Thomas, C. J., Anbazhagan, V., Ramakrishnan, M., Sultan, N., Surolia, I., et Swamy, M. J. (2003) *Biophys. J.* **84**, 3037-3044.
22. Moreau, R., Thérien, I., Lazure, C., et Manjunath, P. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 148-154.
23. Gasset, M., Saiz, J. L., Laynez, J., Sanz, L., Gentzel, M., Töpfer-Petersen, E., et Calvete, J. J. (1997) *Eur. J. Biochem.* **250**, 735-744.
24. Romero, A., Varela, P. F., Töpfer-Petersen, E., et Calvete, J. J. (1997) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **28**, 454-456.
25. Calvete, J. J., Campanero-Rhodes A., Raida, M., et Sanz, L. (1999) *FEBS Lett.* **444**, 260-264.
26. Gasset, M., Magdaleno, L., et Calvete, J. J. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **374**, 241-247.



27. Greube, A., Müller, K., Töpfer-Petersen, E., Herrmann, A., et Müller, P. (2001) *Biochemistry* **40**, 8326-8334.
28. Muller, P., Greube, A., Topfer-Petersen, E., et Hermann, A. (2002) *Eur. Biophys. J.* **31**, 438-447.
29. Swamy, M. J., Marsh, D., Anbazhagan, V., et Ramakrishnan, M. (2002) *FEBS Lett.* **528**, 230-234.
30. Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., et Ménard, M. (2002) *Biol. Reprod.* **67**, 1250-1258.
31. Martin, W. G., Tattre, N. H., et Cook, W. H. (1963) *Can. J. Biochem. Physiol.* **41**, 657-666.
32. Kuksis, A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 205-222.
33. Thérien, I., Bleau, G., et Manjunath, P. (1995) *Biol. Reprod.* **52**, 1372-1379.
34. Thérien, I., Soubeyrand, S., et Manjunath, P. (1997) *Biol. Reprod.* **57**, 1080-1088.
35. Seelig, J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1331**, 103-116.
36. Breukink, E., Ganz, P., de Kruijff, B., et Seelig, J. (2000) *Biochemistry* **39**, 10247-10254.
37. Wieprecht, T., Beyermann, M., et Seelig, J. (1999) *Biochemistry* **38**, 10377-10387.
38. Wenk, M. R., et Seelig, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 3909-3916.
39. Seelig, J., Nebel, S., Ganz, P., et Bruns, C. (1993) *Biochemistry* **32**, 9714-9721.
40. Wieprecht, T., Apostolov, O., et Seelig, J. (2000) *Biophys. Chem.* **85**, 187-198.

41. Heerklotz, H., et Seelig, J. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 69-85.
42. Keller, M., Kerth, A., et Blume, A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1326**, 178-192.
43. Hildebrand, A., Neubert, R., Garidel, P., et Blume, A. (2002) *Langmuir* **18**, 2836-2847.
44. Heerklotz, H. H., Binder, H., et Schmiedel, H. (1998) *J. Chem. Phys. B* **102**, 5363-5368.
45. Wenk, M. R., et Seelig, J. (1997) *Biophys. J.* **73**, 2565-2574.
46. Heerklotz, H., Lantzsch, H., Binder, H., Klose, G., et Blume, A. (1996) *J. Phys. Chem.* **100**, 6764-6774.
47. McLaughlin, S. (1977) *Current topics in membranes and transport* **9**, 71-144.
48. Beschiaschvili, G., et Seelig, J. (1990) *Biochemistry* **29**, 52-58.
49. Percot, A., Zhu, X. X., et Lafleur, M. (1999) *Biopolymers* **50**, 647-655.
50. Surewicz, W. K., et Mantsch, H. H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 115-130.
51. Byler, D. M., et Susi, H. (1986) *Biopolymers* **25**, 469-487.
52. *Subcellular Biochemistry, Volume 23 : Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes, Chapitre 10: Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy-III. Secondary Structures* (Goormaghtigh, E., Cabiliaux, V., & Ruysschaert, J. M. Vol. 23, pp 405-450, Plenum Press, New York, (1994)).
53. Mantsch, H. H., et McElhaney, R. N. (1991) *Chem. Phys. Lipids* **57**, 213-226.
54. Casal, H. L., et Mantsch, H. H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 381-401.

55. Cortijo, M., Alonso, A., Gomez-Fernandez, J. C., et Chapman, D. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 597-618.
56. Kodati, V. R., El-Jastimi, R., et Lafleur, M. (1994) *J. Phys. Chem.* **98**, 12191-12197.
57. Noda, I. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8116-8118.
58. Noda, I. (1990) *Appl. Spectrosc.* **44**, 550-561.
59. Paquet, M.-J., Laviolette, M., Pézolet, M., et Auger, M. (2001) *Biophys. J.* **81**, 305-312.
60. Nabet, A., et Pézolet, M. (1997) *Appl. Spectrosc.* **51**, 466-469.
61. Fiske, C. H. , et Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400.
62. Lafleur M., Cullis P.R., et Bloom M. (1990) *Eur. Biophys. J.* **19**, 55-62.
63. Li, X.-M., Momsen, M. M., Smaby, J. M., Brockman, H. L., et Brown, R. E. (2001) *Biochemistry* **40**, 5954-5963.
64. Brown, D. A., et London, E. (1998) *J. Membrane Biol.* **164**, 103-114.
65. Desnoyers, L., Thérien, I., & Manjunath, P. (1994) Vol. 37, pp. 425-435.
66. Cross, N. L. (1998) *Biol. Reprod.* **59**, 7-11.
67. Carlini, E., Palmerini, C. A., Cosmi, E. V., et Arienti, G. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 6-12.
68. Nabet, A., Boggs, J. M., et Pézolet, M. (1994) *Biochemistry* **33**, 14792-14799.
69. Findlay, E. J., et Barton, P. G. (1978) *Biochemistry* **17**, 2400-2405.

70. Laroche, G., Dufourc, E. J., Pézolet, M., et Dufourcq, J. (1990) *Biochemistry* **29**, 6460-6465.
71. Mouritsen, O. G. (1991) *Chem. Phys. Lipids* **57**, 179-194.
72. Mouritsen, O. G. (1993) *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **22**, 145-171.
73. MacDonald, B. J., et Foulkes, J. A. (1981) *J. Reprod. Fertil.* **63**, 407-414.
74. Watson, P. F. (1975) *J. Reprod. Fertil.* **42**, 105-111.
75. Foulkes, J. A. (1977) *J. Reprod. Fertil.* **49**, 277-284.
76. Thérien, I., Bousquet, D., et Manjunath, P. (2001) *Biol. Reprod.* **65**, 41-51.
77. Thérien, I., Moreau, R., et Manjunath, P. (1998) *Biol. Reprod.* **59**, 768-776.
78. Mine, Y. (1997) *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4558-4563.



Faint, illegible markings or text at the bottom right of the page.