



HAL
open science

Formation de domaines de type "rafts" dans des vésicules unilamellaires et mécanismes physico-chimiques de l'extraction de domaines membranaires

Virginie Coste

► To cite this version:

Virginie Coste. Formation de domaines de type "rafts" dans des vésicules unilamellaires et mécanismes physico-chimiques de l'extraction de domaines membranaires. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT : . tel-00116250

HAL Id: tel-00116250

<https://theses.hal.science/tel-00116250>

Submitted on 24 Nov 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE -
PARIS VI

ÉCOLE DOCTORALE INTER///BIO

Spécialité
Biophysique

Présentée par **Virginie COSTE**

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI

**Formation de domaines de type « rafts » dans des vésicules
unilamellaires et mécanismes physico-chimiques de l'extraction de
domaines membranaires**

Soutenue le 5 juillet 2006 devant le jury composé de :

Mme. Hélène CONJEAUD	Rapporteur
M. Kamen KOUMANOV	Rapporteur
Mme. Maïté PATERNOSTRE	Examineur
Mme. Régine PERZYNSKI	Examineur
Mme. Miglena ANGELOVA	Directrice de thèse
M. Germain TRUGNAN	Co-directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail de quatre années effectué dans le Laboratoire de « Trafic membranaire et signalisation dans les cellules épithéliales », INSERM U538, CHU St Antoine, à Paris. Je souhaiterais en premier lieu exprimer mes remerciements sincères envers le Professeur Germain Trugnan, directeur du laboratoire et co-directeur de ma thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour s'être montré disponible et pour avoir témoigné d'un intérêt toujours constant envers mon travail, dont les préoccupations ont pourtant été parfois assez éloignées de celles de la biologie cellulaire ou de la virologie.

Le Professeur Miglena Angelova a été ma directrice de thèse durant ces quatre années, je voudrais la remercier chaleureusement pour avoir fait confiance à une biologiste dans la réalisation d'un projet de recherche comportant pour sa plus grande part des aspects biophysiques et physico-chimiques. Merci pour m'avoir guidée dans cette voie, je crois avoir beaucoup appris, en particulier sur l'enrichissement que confère le travail aux interfaces de ces deux disciplines que sont la biologie et la physique.

Je tiens vivement à remercier les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour l'intérêt et le regard critique qu'ils ont porté sur mon travail. Merci donc au Docteur Hélène Conjeaud et au Professeur Kamen Koumanov, qui ont accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci au Professeur Régine Perzynski, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, merci enfin au Docteur Maité Paternostre pour avoir été présente en tant qu'examinatrice.

Pendant mon travail de thèse, j'ai pu bénéficier des conseils et du soutien à la fois scientifique et amical de nombreuses personnes. Je voudrais ici les en remercier. Merci donc à Nicolas Puff, qui par son dynamisme, sa disponibilité et son implication dans mon travail a largement contribué à son accomplissement. Merci à Galya Staneva, pour sa patience sans faille dans l'enseignement de la fabrication des GUVs, pour son soutien et son amitié tout simplement. Merci à Michelyne Breton, pour ses conseils avisés et son expertise dans la fabrication des « DRMs ». Merci également à Serge Chwetzoff, et à Catherine Sapin, pour s'être largement investis dans plusieurs aspects de mon travail de thèse.

Grâce à des collaborations, d'autres personnes se sont impliquées dans ma thèse. Même si notre travail conjoint n'a pas encore abouti concrètement, je tiens à exprimer ma

Remerciements

reconnaissance envers Jean Cohen – aujourd’hui disparu – Annie Charpilienne, et Luba Tchertanov, du Laboratoire de Virologie Structurale à Gif sur Yvette.

De façon plus générale, je tiens également à remercier les personnes du laboratoire qui de près ou de loin se sont intéressées à mon travail ou ont rendu mon passage à l’U538 agréable et enrichissant. Mention spéciale à l’équipe de la cantine: Françoise, Karine, Alexis, Emeline, Agnès, Olivier, Antonin, Jacqueline, Lydie, un grand merci pour m’avoir fait partager avec vous ce rendez-vous incontournable qu’était celui du déjeuner à la cantine, j’ai vraiment apprécié ces moments toujours détendus et drôles passés en votre compagnie (et pas seulement à l’heure du déjeuner d’ailleurs).

Enfin, il m’est impossible de terminer cette page sans faire quelques remerciements personnels. Je voudrais d’abord m’adresser à ma famille, mes parents en particulier. Merci pour votre soutien constant et inconditionnel, cela signifie beaucoup pour moi.

Je voudrais aussi avoir une pensée pour tous ceux qui par leur présence et leur amitié m’ont soutenue et accompagnée durant ces années de thèse : U, ma chère U notre rencontre autour du même bureau le premier jour des cours à Pasteur a été providentielle ! Merci à toi et Boune pour votre accueil, votre convivialité, et pour m’avoir permise de rencontrer toute une panoplie de « bons gaillards »!! Un grand merci aussi à Sylvie ; Chantal ; Eléonore ; Brunilde ; Lili ; Adeline ; Karine ; Dolio et Daniel ; l’équipe des restos du cœur : Françoise, Jackie, Marie, Poldi, Yamouna... Vous avez tous d’une façon ou d’une autre partagé mes bonheurs et mes petites misères, merci pour votre présence! Merci enfin à toi Franco, je ne sais comment exprimer le bien qu’a pu me faire ta présence à mes côtés ces deux dernières années, je souhaite juste pouvoir un jour t’en donner autant...

Table des matières

TABLE DES MATIERES.....	4
ABREVIATIONS	7
AVANT-PROPOS.....	10
I. INTRODUCTION GENERALE	13
I.1 Des membranes biologiques... ..	13
I.1.1 Définition.....	13
I.1.2 Composition	14
I.1.2.1 Les glycérophospholipides	15
I.1.2.2 Les sphingolipides.....	17
I.1.2.3 Le cholestérol	18
I.1.2.4 Les protéines	20
I.1.3 Répartition des composants membranaires entre les deux feuillet.....	21
I.1.4 Dynamique moléculaire des membranes.....	22
I.1.4.1 Le modèle de mosaïque fluide	22
I.1.4.2 Le nouveau modèle membranaire : les radeaux lipidiques	25
I.1.5 Mise en évidence et isolement des microdomaines membranaires provenant de membranes biologiques.....	38
I.1.5.1 Méthodes utilisant des détergents	38
I.1.5.2 Méthodes sans utilisation de détergents	44
I.2 ...Aux membranes modèles	49
I.2.1 Définition.....	49
I.2.1.1 Les liposomes.....	50
I.2.1.2 Les vésicules géantes unilamellaires.....	51
I.2.2 La séparation de phase dans les bicouches lipidiques.....	52
I.2.2.1 Définition de la phase lipidique	52
I.2.2.2 Séparation de phase et formation de domaines dans des bicouches lipidiques modèles	53
I.2.2.3 Les phases gel L_{β} et fluide L_{α}	55
I.2.2.4 Origine de la séparation de phase.....	56
I.2.2.5 La phase l_o	62
I.2.3 Apport des membranes modèles à la compréhension des radeaux membranaires biologiques.....	69
I.2.3.1 Radeaux membranaires cellulaires et phase l_o	69
I.2.3.2 Triton X-100 et solubilisation des mélanges lipidiques modèles.....	71
II. FORMATION DE DOMAINES “RAFT-LIKE” DANS DES LUVS MARQUEES PAR L’ANALOGUE PHOSPHOLIPIDIQUE FLUORESCENT C12NBD-PC	73
II.1 Introduction	73

II.2	Méthodologie.....	76
II.2.1	Matériels utilisés.....	76
II.2.2	Préparation des vésicules.....	77
II.2.2.1	Vésicules de type LUV.....	77
II.2.2.2	Vésicules de type GUV.....	79
II.2.3	Microscopie à fluorescence.....	80
II.2.4	Mesures en spectrophotométrie à fluorescence.....	81
II.2.4.1	Mesures.....	81
II.2.4.2	Principe de mise en évidence de la coexistence de phase sur les LUVs.....	84
II.3	Fluorescence du C12NBD-PC dans des membranes lipidiques homogènes sans coexistence de phase.....	85
II.3.1	Effet de l'environnement sur la fluorescence dans des membranes homogènes.....	85
II.3.2	Extinction de fluorescence du C12NBD-PC dépendante de la concentration dans des membranes homogènes.....	87
II.4	Fluorescence du C12NBD-PC dans des membranes lipidiques hétérogènes présentant une coexistence de phase.....	89
II.4.1	Approche expérimentale.....	89
II.4.1.1	Mise en évidence de la coexistence de phase l_o/l_d sur des GUVs.....	89
II.4.1.2	Mise en évidence de la coexistence de phase l_o/l_d sur des LUVs.....	91
II.4.2	Approche théorique.....	93
II.4.3	Estimation quantitative des fractions membranaires Φ_o et Φ_d, occupées par les phases l_o et l_d en utilisant les courbes de calibration.....	95
II.5	Reproductibilité des préparations de LUVs et des scans de température.....	98
II.6	Discussion.....	100
III.	COMMENT EXTRAIRE SELECTIVEMENT LES DOMAINES EN PHASE L_o DE VESICULES UNILAMELLAIRES DE TYPE LUVS A L'AIDE DE TRITON X-100 ?.....	102
III.1	Introduction.....	102
III.2	Méthodologie.....	105
III.2.1	Matériels utilisés.....	105
III.2.2	Préparation des liposomes.....	105
III.2.3	Obtention de « Triton X-100 insoluble floating fractions » (TIFFs).....	106
III.3	Evaluation de la présence de fractions flottantes insolubles au Triton X-100 (TIFFs) dans les LUVs.....	108
III.4	Dépendance des TIFFs vis-à-vis de la concentration en Triton X-100.....	110
III.4.1	Membranes lipidiques à deux composants.....	110
III.4.2	LUVs hétérogènes (coexistence de phase l_o/l_d).....	112
III.5	Discussion.....	116

IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	120
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127
LISTE DES FIGURES	139
LISTE DES TABLEAUX.....	145
ARTICLES.....	146

Abréviations

AFM	« Atomic force microscopy » : microscopie à force atomique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BCR	Récepteur des cellules B
C12NBD-PC	1-acyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine
CFTR	« Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator »
Chol	Cholestérol
DIC	« Detergent-insoluble complex » : complexe insoluble aux détergents
DIG	« Detergent-insoluble glycolipid-rich domain »: domaine riche en glycolipides insoluble aux détergents
DLPC	Dilauroylphosphatidylcholine
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
DPH	1,6-diphenylhexatriène
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPSM	Dipalmitoylsphingomyéline
DSPC	Disteroylphosphatidylcholine
DRM	« Detergent-resistant membrane » : membrane résistante aux détergents
DSC	« Differential scanning calorimetry »
ESR	« Electron spin resonance » : résonance de spin électronique
FcεRI	Récepteur à haute affinité de l'immunoglobuline E
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy : spectroscopie de corrélation de fluorescence

Abréviations

FRAP	« Fluorescence recovery after photobleaching » : récupération de la fluorescence après photoblanchiment
FRET	« Fluorescence resonance energy transfer » : transfert d'énergie de fluorescence
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
Glc	Glucose
GEEC	Compartiment endosomal précoce enrichi en protéines à ancre GPI
GM1	Ganglioside monosialide 1
GPI	Glycosyl-phosphatidyl inositol
GTPase	Guanosine triphosphatase
GUV	« Giant unilamellar vesicle » : vésicule géante unilamellaire
HA	Hémagglutinine : glycoprotéine de surface du virus de la grippe
Chol	[1 α , 2 α (n)- ³ H] Cholesterol
LDM	« Low-density membrane »: membrane de basse densité
LUV	« Large unilamellar vesicle »: vésicule unilamellaire de taille moyenne
MDCK	“Madin-Darby canine kidney”: cellule de rein de chien de Madin-Darby
MLV	« Multilamellar vesicle » : vésicule multilamellaire
NA	Neuraminidase : glycoprotéine de surface du virus de la grippe
NANA	Acide N-acétylneuraminique
NBD	Nitrobenzoxadiazole
TIFF	« Triton X-100 insoluble floating fraction »: fraction flottante insoluble au Triton X-100
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PLAP	« Placental alkaline phosphatase »

Abréviations

PS	Phosphatidylsérine
POPC	Palmitoyloléoylphosphatidylcholine
PrP	Protéine prion
PrPsc	Protéine prion scrapie
PSM	Palmitoyl-sphingomyéline
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rhod-PE	Rhodamine-phosphatidyléthanolamine
12SLPC	1-palmitoyl-2-(12-doxy)stéaroylphosphatidylcholine
SM	Sphingomyéline
SOPC	Steroyloléoylphosphatidylcholine
SPT	« Single particle tracking » : suivi de particule unique
SUV	« Small unilamellar vesicle » : vésicule unilamellaire de petite taille
SV 40	« Simian Virus 40 » : virus simien 40
TCR	Récepteur des cellules T
TCZ	« Transient confinement zone » : zone de confinement transitoire
T _M	« Melting temperature » : température de transition de phase
TX-100	Triton X-100
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Avant-propos

La bicouche lipidique constituant la membrane des cellules est un crystal-liquide bidimensionnel, dont l'organisation est l'objet de recherches intensives depuis le milieu des années 70 de la part des biochimistes et biophysiciens. Pendant près de 40 ans, le modèle membranaire qui a prévalu a été celui proposé par Davson et Danielli (Danielli and Davson, 1935). Il présentait la membrane cellulaire comme une bicouche contenant seulement des phospholipides, des lipides neutres (tels que le cholestérol), et des glycolipides, les protéines membranaires recouvrant les deux interfaces polaires de la bicouche. Le nouveau modèle membranaire proposé par Singer et Nicolson dit de mosaïque fluide, et consacré au début des années 70 a constitué une avancée majeure car, d'une part les protéines amphiphiles ont été reconnues comme résidant au sein de la bicouche, et d'autre part car la membrane a été dès lors considérée comme une structure dynamique (Singer and Nicolson, 1972). Des recherches réalisées depuis sur les membranes biologiques et modèles ont conduit à des modifications importantes du modèle de Singer et Nicolson. Des études fonctionnelles portant sur le trafic de protéines et de lipides ont suggéré que les lipides et protéines membranaires n'étaient pas distribués de façon aléatoire dans la membrane (Lisanti and Rodriguez-Boulan, 1990; van Meer and Simons, 1988). Elles ont conduit à l'émergence d'une nouvelle approche de la structure des membranes biologiques, les présentant comme des mélanges hétérogènes organisés en domaines dont certains exercent des fonctions biologiques importantes. Les membranes lipidiques modèles, même si elles ne rendent pas compte de la complexité des membranes cellulaires et notamment ni de l'asymétrie de répartition des lipides, ni des interactions protéines-protéines, ont concouru à la connaissance actuelle des membranes biologiques et représentent en ce sens un outil indispensable à leur étude. Le recours à des membranes modèles aux caractéristiques physico-chimiques définies permet en effet d'approcher certains comportements de base de la membrane biologique. Ainsi, l'utilisation de mélanges lipidiques modèles a conduit à la description de la structure (ou phase) des domaines fonctionnels identifiés dans les membranes cellulaires, il s'agit d'une structure liquide ordonnée.

Dans quelle mesure les membranes modèles peuvent nous aider à mieux comprendre les mécanismes de formation des domaines lipidiques de type liquide ordonné, et à améliorer les outils disponibles d'études sur les domaines cellulaires a été le point central de notre étude. Nous nous sommes en effet intéressés à la caractérisation et à la possibilité d'isoler des

domaines en phase liquide ordonnée sur des membranes modèles de petite taille (100 nm). Pour cela, nous avons utilisé deux approches différentes. L'une, reposant sur les propriétés d'auto-extinction de fluorescence d'une sonde lipidique fluorescente a permis la mise en évidence de la coexistence de phases lipidiques liquide ordonnée/liquide désordonnée au sein de ce type de membrane modèle. L'autre, basée sur l'extraction de domaines par un détergent aborde la caractérisation sous un aspect plus physico-chimique.

La première partie de ce travail consiste en une revue de la littérature concernant les membranes lipidiques. Une première sous-partie s'intéressera aux membranes biologiques : leur composition et leur dynamique. L'accent sera porté en particulier sur la mise en évidence d'une hétérogénéité dans la distribution des constituants membranaires et la signification biologique de ce phénomène. Ensuite, une deuxième sous-partie sera consacrée aux membranes modèles et après les avoir définies, exposera la notion de phase lipidique et de séparation de phase au sein des membranes, et l'intérêt des modèles membranaires pour la compréhension des membranes biologiques.

La deuxième partie de ce manuscrit portera sur les travaux utilisant la fluorescence. Le but de cette étude était (i) de mettre en évidence sur des membranes modèles de type vésicules unilamellaires de 100 nm (LUVs) une coexistence de phases liquides ordonnée/désordonnée, et (ii) d'apprécier quantitativement la fraction de surface membranaire occupée par les domaines en phase ordonnée. Ceci a été effectué à l'aide d'une sonde lipidique fluorescente possédant des propriétés particulières : capacité d'auto-extinction dépendante de sa concentration d'une part, partition différente entre les phases lipidiques d'autre part. Cette étude est l'objet d'un article disponible à la fin de ce manuscrit: Coste, V., Puff, N., Lockau, D., Quinn, P.J. and Angelova, M.I. (2006). Raft-like domain formation in large unilamellar vesicles probed by the fluorescent phospholipid analogue, C12NBD-PC. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 460-467.

La troisième partie de cette thèse exposera les résultats relatifs à l'étude de la solubilisation à 4°C du même type de membranes modèles par un détergent non ionique : le Triton X-100. L'objet de ce travail est relié aux controverses nées de l'utilisation de détergents pour l'identification des radeaux lipidiques. Ainsi, après avoir démontré dans la partie précédente la possibilité d'une coexistence de phase sur des membranes modèles de type LUV, nous nous attacherons à démontrer qu'il est possible d'extraire par le détergent Triton X-100, à partir de ce modèle de membrane, les fractions membranaires se trouvant strictement en phase l_0 . Pour cela, les transitions de structure induites par l'interaction du

Triton X-100 avec des LUVs à 4°C seront étudiées en fonction de la quantité de détergent et de lipides en présence, par une procédure de séparation par gradient de densité, semblable à celle utilisée pour isoler les DRMs biologiques. Les résultats de solubilisation différentielle sont interprétés comme rendant possible la séparation biochimique des domaines ordonnés. Ce travail est également l'objet d'un article qui est inséré à la fin du manuscrit : Coste, V., Breton, M., Angelova, M.I. and Puff, N. (2006). How to extract selectively the lo-phase domains from large unilamellar vesicles with Triton X-100? *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* **282–283**, 402–409.

Enfin la quatrième et dernière partie consistera en une discussion générale et les perspectives possibles de ce travail.

I. Introduction générale

I.1 Des membranes biologiques...

I.1.1 Définition

Les cellules sont définies comme étant les unités fonctionnelles fondamentales des systèmes vivants. Deux types de cellules se distinguent: les procaryotes qui possèdent une organisation interne simplifiée sans noyau, et les eucaryotes qui présentent une structure interne plus complexe, avec notamment un noyau bien défini. Dans chacun des deux types cellulaires, l'intégrité de la cellule est préservée grâce à la présence d'une enveloppe externe appelée membrane plasmique. L'existence de cette membrane représente un des fondements majeurs de l'organisation de la vie car elle a permis d'isoler le contenu cellulaire du monde extérieur tout en autorisant des échanges contrôlés. C'est dans les cellules eucaryotes qu'apparaît tout le potentiel de la membrane (Figure I-1). En effet, le contenu de ces dernières est recloisonné en un grand nombre de compartiments fonctionnels formant les organites intracellulaires qui sont bordés par une, voire deux membranes (comme l'enveloppe nucléaire). Enfin, certains organites spécialisés dans la conversion d'énergie (mitochondries, chloroplastes) renferment un très grand nombre de membranes internes ou présentent des repliements très complexes de l'une des membranes qui les enveloppent. Mais le rôle des membranes ne se limite pas à celui de cloisonnement. Elles interviennent aussi dans une variété de processus biologiques indispensables à la vie comme les phénomènes de transport, la transduction signalétique, les processus de conversion d'énergie, etc. La membrane plasmique repose de plus sur une charpente dynamique – le cytosquelette – formée d'un réseau de filaments protéiques, qui rend possible la motilité cellulaire, contribue à maintenir la forme de la cellule et la cohésion des tissus, et enfin, sert de guide pour le transport de molécules indispensables à l'activité cellulaire.

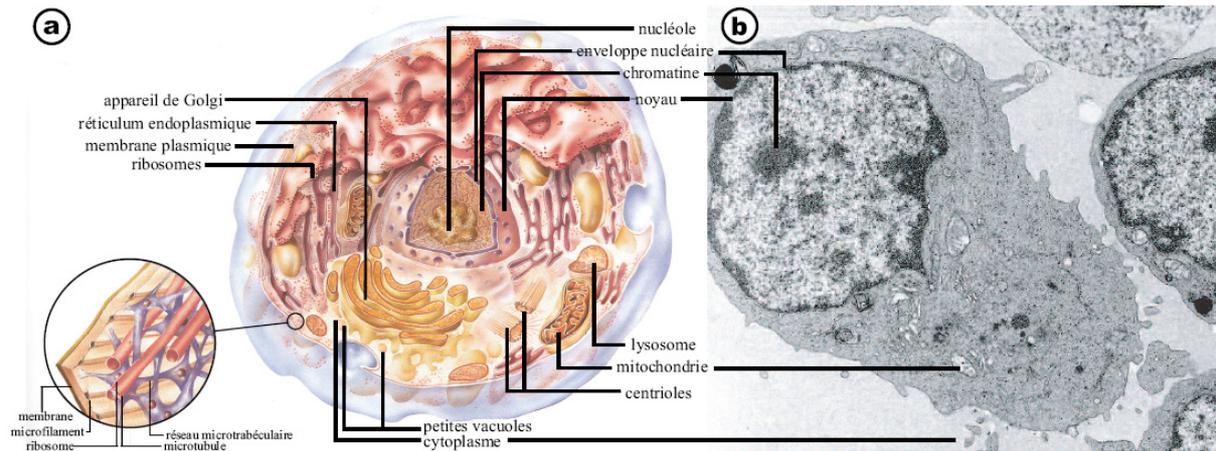


Figure I-1. (a) Vue schématique d'une cellule eucaryote. Elle possède une organisation interne très complexe : le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries constituent les principales sous-unités de la cellule. (b) Cellule du thymus vue au microscope électronique à transmission (x 10 000). D'après (<http://biogeol.free.fr/Cours+/cell03.htm>).

I.1.2 Composition

Les membranes biologiques sont formées principalement de lipides disposés en double feuillet, et de protéines définissant des activités propres à la membrane.

Les lipides membranaires représentent 30 à 50 % de la masse membranaire selon le type d'organite. Ce sont des molécules amphiphiles qui comportent une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Les membranes vont se former grâce aux propriétés amphiphiles des lipides constitutifs. En effet, dans l'eau – principal composant des cellules et du milieu extracellulaire – les lipides s'orientent spontanément pour former une double couche, dans laquelle les queues hydrophobes se font face en raison de leur affinité réciproque, et les têtes polaires sont dirigées vers l'eau (Figure I-2). L'organisation ainsi créée minimise l'énergie du système (énergie libre de Gibbs), critère physique important pour la stabilité de l'édifice. Les forces en jeu permettant de la maintenir sont de faible énergie, il s'agit d'interactions hydrophobes et d'interactions de van der Waals. Les protéines sont quant à elles enchâssées dans la double couche lipidique et contribuent non seulement à sa solidité, mais surtout remplissent des fonctions essentielles (échanges et communications). La charpente des membranes cellulaires est donc une construction supramoléculaire de lipides associés à des protéines, dont les molécules sont régulièrement orientées, ce qui leur assure à la fois cohésion et souplesse.

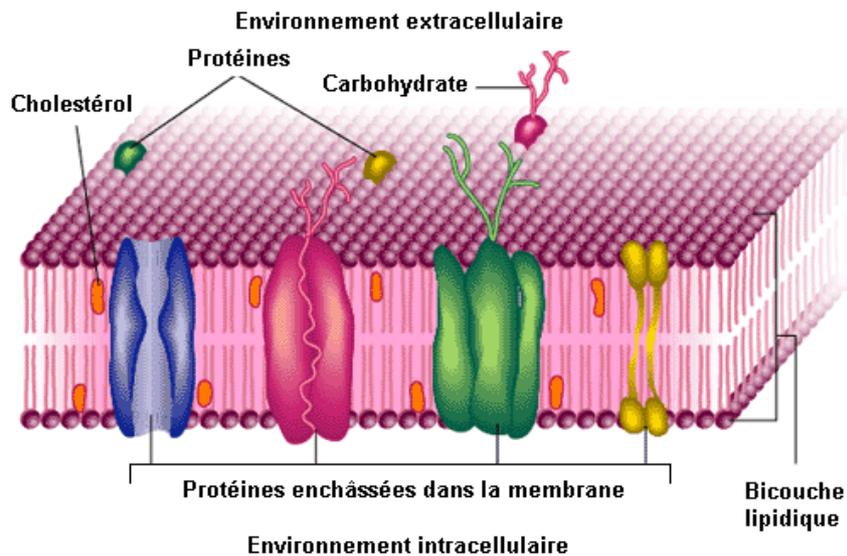


Figure I-2. Représentation schématique d'une membrane biologique. La membrane est constituée d'un double feuillet lipidique associé à des protéines.

Les membranes biologiques ont une épaisseur comprise entre 7 et 8 nm. La nature des lipides constitutifs varie en fonction du type cellulaire, du type d'organites ou bien encore du stade de croissance de la cellule (Simons and Gruenberg, 2000; van Meer, 1998). La variété des espèces lipidiques est très étendue. Ainsi une membrane plasmique typique de cellule de mammifère renferme huit différentes classes majeures de lipides, chacune présentant de plus de grandes variations dans la structure chimique des espèces lipidiques (White, 1973). Les principaux lipides rencontrés sont des glycérophospholipides, des sphingolipides et des stérols. On retrouve également un certain nombre de composants moins abondants tels que des lysolipides.

I.1.2.1 Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides constituent la famille de lipides la plus répandue dans les membranes biologiques, ils sont particulièrement abondants dans les membranes internes. Ils présentent à la fois une partie hydrophobe définie par de longues chaînes hydrocarbonées, et une partie hydrophile, du fait de la présence d'une tête polaire. La structure plus détaillée consiste en un squelette de base glycérol, sur lequel deux des fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras, constituant les chaînes hydrocarbonées hydrophobes (généralement supérieures à 16 atomes de carbone), dont une est habituellement insaturée. La tête polaire est constituée d'un groupement phosphate, substituant la troisième fonction alcool du squelette

glycérol. Le phosphate est suivi par un groupement alcool déterminant la classe du glycérophospholipide. Il s'agit classiquement de la choline, l'éthanolamine, la sérine, ou l'inositol. La phosphatidylcholine (PC) est le lipide membranaire standard représentant 50% des lipides cellulaires (van Meer, 2005). La formule chimique des glycérophospholipides les plus communs est indiquée sur la figure I-3 A et B. Une illustration de l'orientation des phospholipides dans la membrane est indiquée dans la figure I-3.B(c). Enfin le tableau 1 montre les principales chaînes d'acides gras retrouvées à l'état naturel.

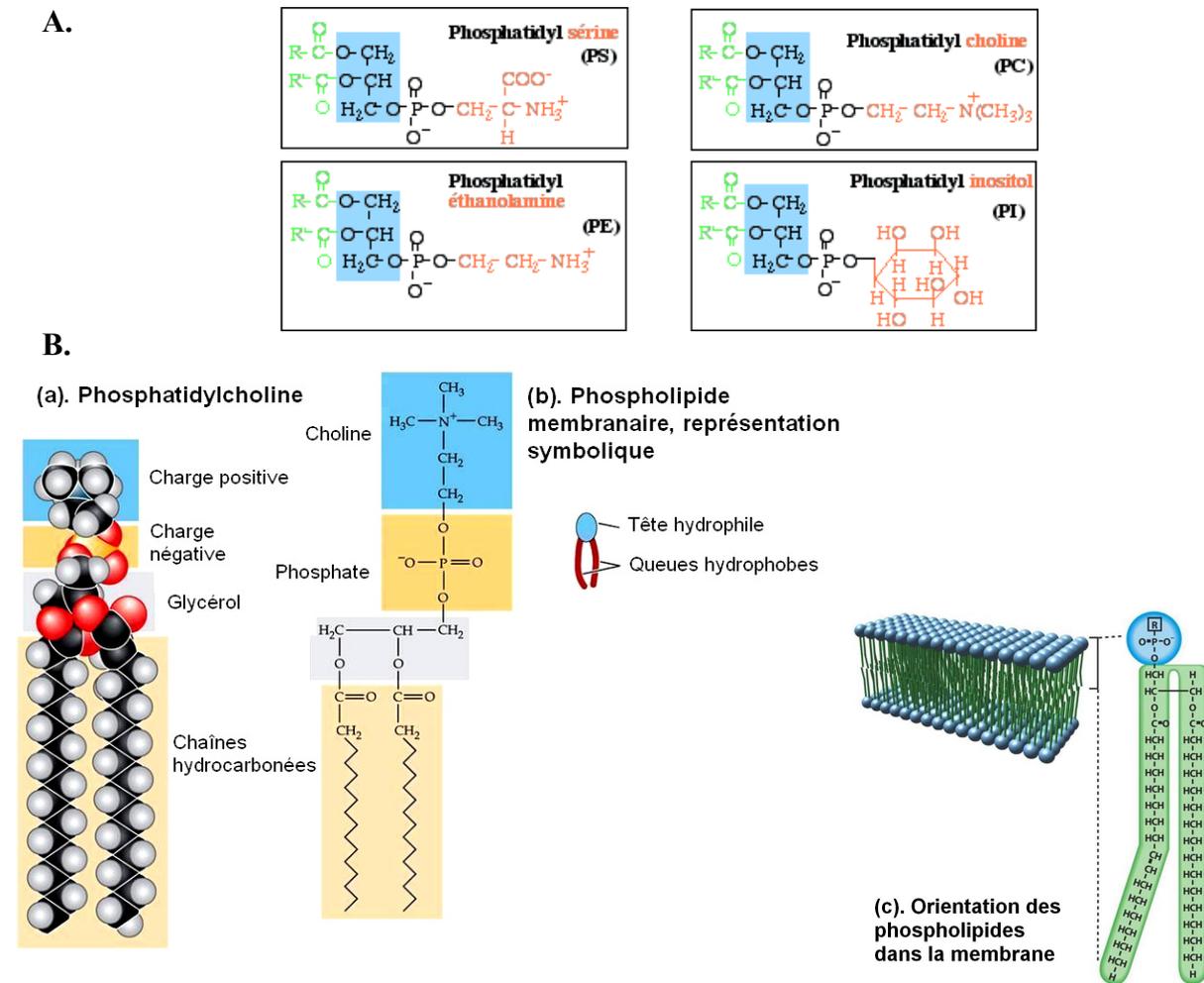


Figure I-3. A) Formule détaillée de la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), et le phosphatidylinositol (PI). B) (a) Structure et formule chimique d'un phospholipide : la phosphatidylcholine, à gauche : modèle compact, au centre : formule chimique. (b) Représentation symbolique des phospholipides. (c) Modèle de l'orientation des phospholipides dans la membrane. Données adaptées de (Purves et al., 2003).

Symbole	Structure chimique	Nom systématique de l'acide	Nom commun de l'acide
C12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Dodécanoïque	laurique
C14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Tétradécanoïque	myristique
C16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Hexadécanoïque	palmitique
C18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Octadécanoïque	stéarique
C20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Icosanoïque ¹	arachidique
C22 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	Docosanoïque	béhénique
C24 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Tétracosanoïque	lignocérique
C18 : 1(9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> -9-octadécénoïque	oléique
C18 : 2(9,12)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis,cis</i> -9,12-octadécadiénoïque	linoléique
C20 : 4(5,8,11,14)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-icosatétrénoïque	arachidonique

Tableau 1 : Quelques uns des principaux acides gras saturés et insaturés retrouvés à l'état naturel. D'après (Nomenclature, 1978).

I.1.2.2 Les sphingolipides

Les sphingolipides forment une famille de lipides caractérisée par la présence d'un squelette de base sphingosine : un amino-alcool possédant une longue chaîne hydrocarbonée insaturée (C18:1). Au niveau de la partie apolaire, un acide gras saturé (ou plus rarement insaturé) à longue chaîne (le plus souvent de 18 à 24 carbones dans les sphingolipides de mammifères) est greffé sur la fonction amine par liaison amide, formant une céramide. Le groupement polaire du lipide est greffé sur la fonction alcool primaire de la sphingosine. Les sphingolipides constituent une famille très nombreuse en raison de la diversité des groupements polaires. En fonction de ceux-ci, on distinguera les céramides, la sphingomyéline (SM) et les glycosphingolipides (voir la figure I-4; pour la structure de la SM, se référer à la figure I-6). Le groupement polaire correspond à une phosphocholine ou phosphoéthanolamine dans le cas de la SM, et un mono- ou un oligosaccharide dans le cas des glycosphingolipides, dont la dénomination est alors respectivement cérébrosides ou gangliosides. Les gangliosides comprennent un ou plusieurs acides sialiques (ou acide N-acétylneuraminique) dans leur partie glucidique (exemple du GM1 ou ganglioside monosialide 1 dans la figure I-4.B). La SM représente 10 à 20 % molaire des lipides membranaires, tandis que les glycosphingolipides sont présents habituellement à des niveaux faibles (Simons and van Meer, 1988).

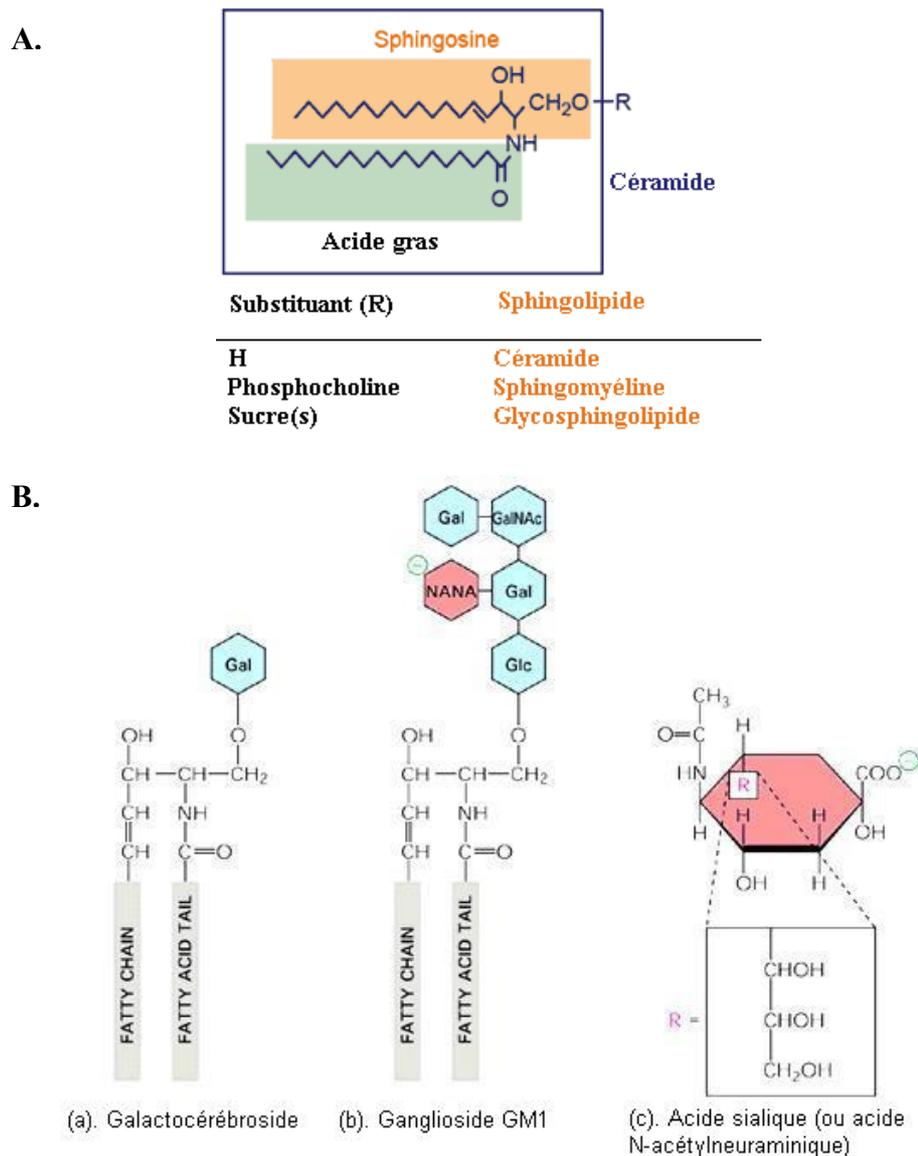


Figure I-4. Molécules de sphingolipides. A) Les sphingolipides sont des dérivés de la sphingosine. Ils varient selon la fonction greffée au niveau de l'hydroxyle en position 1 de la sphingosine. B) Les glycosphingolipides correspondent à la substitution en position 1 de mono- ou oligosaccharides. (a) Exemple d'un cérebroside : le galactocérebroside. (b) Exemple d'un ganglioside : le GM1 (ganglioside monosialide 1). (c) Structure de l'acide sialique ou acide N-acétylneuraminique ou NANA, faisant partie du GM1. Gal = galactose; Glc = glucose, GalNAc = N-acétylgalactosamine. D'après Molecular Biology of the Cell, third edition.

I.1.2.3 Le cholestérol

Le cholestérol (Chol) et ses dérivés constituent une autre catégorie importante de lipides membranaires : les stérols. Le Chol est la forme la plus représentée chez les vertébrés.

La structure de base du Chol est un squelette hydrocarboné de quatre cycles rigides et plans, présentant un groupement hydroxyle qui constitue la seule partie polaire de la molécule et lui confère un caractère amphiphile (Figure I-5). Le noyau stérol se poursuit par une chaîne ramifiée à 8 carbones.

L'insertion de Chol entre les phospholipides au niveau des membranes se fait de telle façon que la partie hydrophile est au contact des têtes polaires des phospholipides, et la partie hydrophobe au niveau des chaînes d'acides gras, dans le cœur hydrophobe de la bicouche (Figure I-5) (Ohvo-Rekila et al., 2002; Yeagle, 1985). Elle permet à la membrane d'acquérir une structure relativement rigide tout en autorisant une certaine mobilité aux composants membranaires. Grâce aux interactions ainsi mises en jeu avec les phospholipides avoisinants, le Chol modulera profondément les propriétés physiques, structurales et dynamiques des membranes qui le contiennent. Cet aspect sera abordé dans un prochain paragraphe. (Pour une comparaison des structures de chacun des principaux composants membranaires, se référer à la figure I-6).

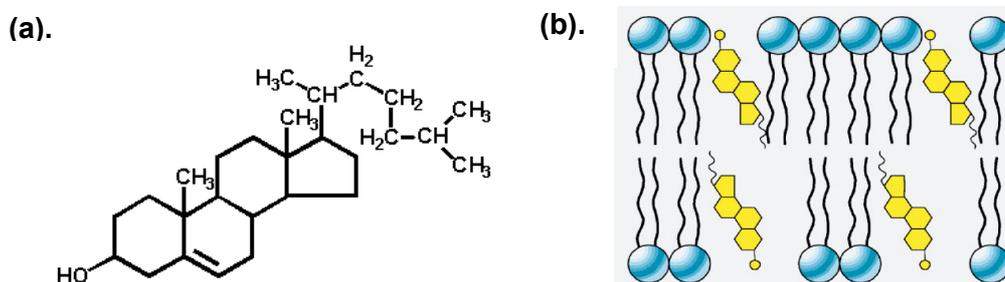


Figure I-5. (a) Formule chimique du Chol. (b) Représentation schématique de l'insertion du Chol au niveau des membranes. La molécule de Chol s'oriente de la même manière que les phospholipides : sa partie hydrophile au contact des têtes polaires des phospholipides, et sa partie hydrophobe dans le cœur hydrophobe de la bicouche. D'après : (<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/cholesterol.jpg>).

Le Chol est particulièrement abondant au niveau des membranes plasmiques d'organismes eucaryotes comme la levure et des cellules de mammifères chez qui il représente 30 à 40 % molaire des lipides de la membrane plasmique (Lange et al., 1989; Liscum and Underwood, 1995; Schroeder et al., 1996). En revanche il est très peu présent

voire pratiquement absent des membranes internes (Lange and Steck, 1996; Lange et al., 1999) ainsi que chez les procaryotes.

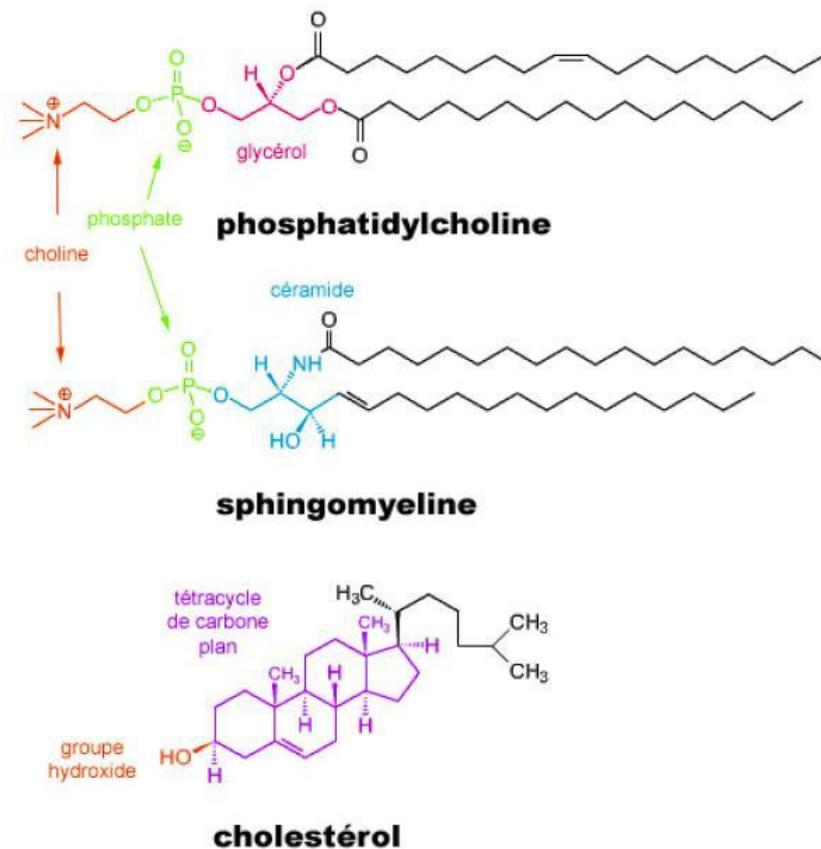


Figure I-6. Comparaison des structures chimiques des trois composants majeurs des membranes cellulaires. Un glycérophospholipide : la PC, un sphingolipide : la SM et le Chol. Les chaînes carbonées apparaissent en noir. Adapté de : www.avantilipids.com.

I.1.2.4 Les protéines

Si les lipides membranaires sont essentiels à la compartimentation des cellules et des organites internes, des protéines présentes au sein de la membrane sont également nécessaires pour assurer des fonctions biologiques spécifiques (structurelles et/ou fonctionnelles). Des protéines membranaires normales et fonctionnelles sont vitales pour la santé, un grand nombre de maladies liées à des anomalies de ces protéines sont répertoriées. Citons par exemple la maladie d'Alzheimer dans laquelle la pathogenèse ferait intervenir une protéine transmembranaire APP, précurseur du peptide β -amyloïde responsable de la neurotoxicité (Lorenzo et al., 2000), ou encore la mucoviscidose, due à un défaut de fonction d'une protéine

transmembranaire CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) intervenant dans la régulation du transport des ions chlore.

Les protéines membranaires peuvent être classées en deux catégories sur la base de la nature de leurs interactions avec la membrane: les protéines intégrales et les protéines périphériques. La plupart des membranes renferment les deux types de protéines. Les protéines membranaires dites intégrales, également appelées protéines intrinsèques, présentent au moins une partie incluse dans la membrane. Certaines protéines intégrales possèdent un ou plusieurs segments protéiques de nature hydrophobe localisés à l'intérieur de la bicouche phospholipidique. La plupart d'entre elles s'étendent sur toute l'épaisseur de la bicouche. D'autres sont ancrées à l'un ou l'autre feuillet de la bicouche par des chaînes hydrocarbonées, auxquelles elles sont reliées de façon covalente. Dans ces protéines, la chaîne polypeptidique ne pénètre pas dans la membrane. Un exemple classique de ce type d'ancre est le glycosylphosphatidylinositol (GPI), qui relie certaines protéines à la face exoplasmique de la membrane plasmique. Les protéines membranaires périphériques, ou protéines extrinsèques, n'interagissent pas avec le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique. Elles sont reliées à la membrane indirectement par des interactions avec des protéines intégrales, ou directement par des interactions avec les têtes polaires des lipides.

Les protéines membranaires peuvent être très abondantes au niveau de certaines membranes. On peut citer l'exemple de la membrane interne mitochondriale où on détecte 76% de protéines (Lodish et al., 2000). Ceci démontre l'importance de cette famille de protéines dans un grand nombre de fonctions biologiques telles que la signalisation, la bioénergétique, l'adhésion, la reconnaissance, le transport de soluté. Cependant, alors que plusieurs milliers de structures de protéines solubles ont été déterminées, seules les structures de 93 protéines membranaires ont été résolues à l'heure actuelle. (Données issues de : <http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>). Ce manque de connaissance sur la structure des protéines membranaires s'explique par la grande difficulté à isoler et à cristalliser ce type de protéines.

I.1.3 Répartition des composants membranaires entre les deux feuillets

Dans les membranes plasmiques des cellules eucaryotes, la plupart des lipides sont généralement présents dans les deux feuillets de la bicouche lipidique. Cependant une

asymétrie de répartition des lipides est observée. La PC et la SM sont localisées de façon prédominante au niveau du feuillet exoplasmique, contrairement aux aminophospholipides (PS et PE) que l'on rencontre davantage dans le feuillet cytoplasmique. Les lipides mineurs tels que le PI et l'acide phosphatidique sont plus représentés sur le feuillet cytoplasmique alors que les glycosphingolipides sont rencontrés davantage sur le feuillet exoplasmique (Bretscher, 1973). Ce schéma de répartition est sans doute une propriété ubiquitaire des cellules animales (Devaux and Morris, 2004).

La distribution transmembranaire des acides gras est difficile à déterminer expérimentalement, et doit varier considérablement d'un type cellulaire à l'autre. Dans la membrane plasmique d'érythrocyte – la membrane biologique la plus étudiée – le feuillet interne renferme plus de lipides insaturés que le feuillet externe (Devaux and Morris, 2004).

La connaissance de la distribution du Chol est elle aussi encore incertaine. Le Chol transloque rapidement d'un feuillet à l'autre et se transfère aisément en tant que monomère entre les membranes (Baumann et al., 2005). Cependant, l'équilibre de la distribution transmembranaire n'est pas seulement déterminé par le niveau d'échange entre les monocouches de la membrane, il est également dépendant de l'affinité du Chol pour les autres lipides et protéines composant la membrane, et qui ne sont pas distribués symétriquement. Une asymétrie dans la distribution du Chol dans les feuillets a été mise en évidence pour différents types cellulaires et grâce à différentes techniques (McIntosh et al., 2003; Morris et al., 2004), et a révélé dans les érythrocytes notamment, une présence préférentielle dans le feuillet interne (à 75%) (Schroeder et al., 1991). Il est donc clair que le Chol peut exister dans un feuillet comme dans l'autre, mais que sa distribution ne s'égalise pas entre les deux feuillets.

I.1.4 Dynamique moléculaire des membranes

I.1.4.1 Le modèle de mosaïque fluide

Le modèle depuis longtemps établi pour décrire l'assemblage et la dynamique des lipides constitutifs de la membrane a été proposé en 1972 par Singer et Nicolson (Singer and Nicolson, 1972). Ce concept dit « modèle de la mosaïque fluide » envisage la membrane

lipidique comme un fluide bidimensionnel homogène dans lequel baignent des protéines mobiles (Figure I-7). Les mouvements dans cette matrice lipidique sont rendus possibles grâce à la nature et l'état physique des lipides. Au-dessus de la température de fusion T_M des chaînes acyles lipidiques, température au-dessus de laquelle les chaînes hydrophobes entrent en fusion, le cœur hydrophobe va présenter une viscosité basse, une consistance fluide dite phase fluide L_α . C'est une condition nécessaire à la survie des cellules, car tous les phénomènes de la physiologie cellulaire impliquent une importante participation de la fluidité membranaire. Ainsi au-dessous de cette température de fusion, la membrane adopte une phase solide gel dans laquelle les mouvements sont réprimés, un état qui serait donc incompatible avec l'activité cellulaire. Nous aborderons plus en détails dans un chapitre ultérieur la notion de phase lipidique. Face à des changements de température, la cellule devra donc constamment ajuster la composition en acides gras et Chol de ses membranes, afin de maintenir leur fluidité.

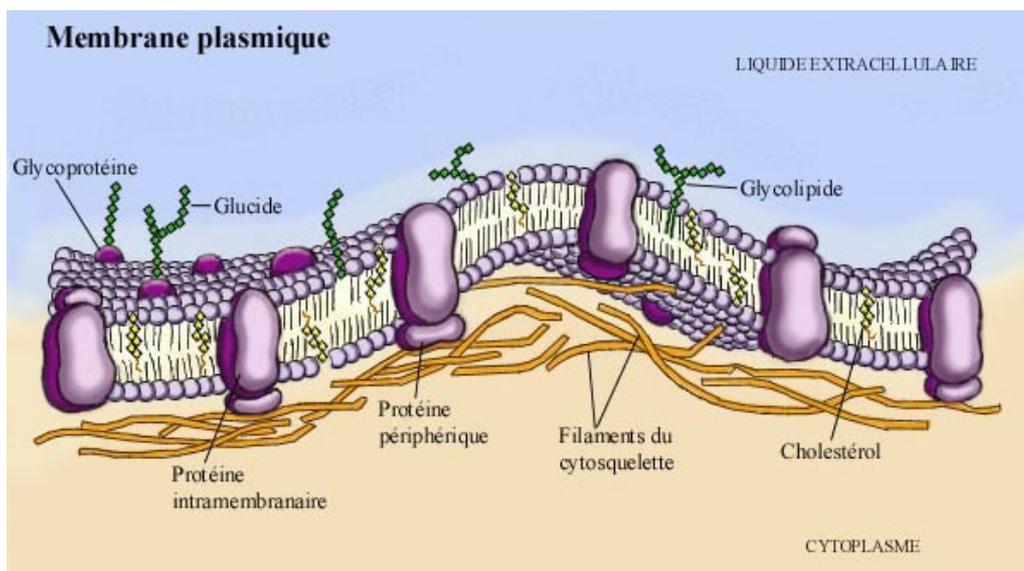


Figure I-7. Schéma représentant la dynamique des membranes biologiques : le modèle de la mosaïque fluide.

D'après (<http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/Biologie/Cellule/membrane-feuilles-etudiants-2.html>).

Le modèle de mosaïque fluide repose sur la dynamique de la membrane. Les lipides sont perpétuellement en mouvement : diffusion latérale par mouvement brownien (Lipowsky and Sackmann, 1995), rotation libre autour de leur axe, et oscillation sur leur axe

(« wobble »). Dans ces mouvements, les chaînes d'acides gras demeurent dans l'intérieur hydrophobe des membranes (Figure I-8). En revanche, le mouvement de migration d'un feuillet de la bicouche à l'autre ou « flip-flop » existe mais se produit très rarement, excepté pour le Chol. Il s'agit en effet d'un processus extrêmement défavorable énergétiquement au sein des bicouches pures de phospholipides car les têtes polaires des lipides doivent dans ce cas être transloquées à travers l'intérieur hydrophobe de la membrane. La diffusion intrinsèque des glycérolipides et sphingolipides entre les feuillets de la bicouche nécessite alors plusieurs heures (van Meer, 2005). Elle peut avoir lieu néanmoins au sein des membranes biologiques grâce à la présence de protéines, les « flippases » qui catalysent ce transport indépendamment de l'hydrolyse d'ATP. D'autres protéines, les « translocases » facilitent aussi ce mouvement, mais dans un processus dépendant de l'ATP, à l'origine de l'asymétrie de répartition des lipides entre les feuillets (van Meer, 2005). Dans « cette mer de lipides », les protéines membranaires se déplacent également, toutefois beaucoup plus lentement que les lipides en raison de leur taille, et de leur attachement possible au cytosquelette.

Les mouvements latéraux des lipides et protéines ont fait l'objet d'études quantitatives dans différents types cellulaires à l'aide de techniques variées. Il est apparu que la viscosité locale dans les feuillets cytoplasmiques et exoplasmiques était différente. Des méthodes telles que la résonance de spin électronique (ESR) (Seigneuret et al., 1984), et la récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) (Morrot et al., 1986) ont indiqué que le feuillet cytoplasmique des membranes érythrocytaires humaines était plus fluide que le feuillet exoplasmique. Les mesures de diffusion latérale réalisées par FRAP à 20°C ont donné les valeurs de coefficient de diffusion suivantes : $1,08 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le feuillet externe, et $5,14 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le feuillet interne (Morrot et al., 1986). Des expériences effectuées ensuite sur des fibroblastes humains (El Hage Chahine et al., 1993) et des cellules endothéliales (Julien et al., 1993) ont permis de conclure de la même façon que la viscosité du feuillet interne était moins importante que celle du feuillet externe. La différence de viscosité observée entre les deux feuillets ne serait pas le fait de la différence de contenu en Chol, mais serait due plus vraisemblablement à la différence de composition des chaînes d'acides gras dans les deux feuillets (Cribier et al., 1990).

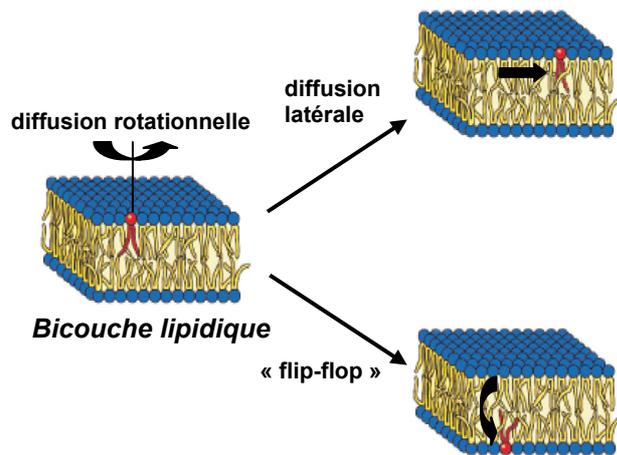


Figure I-8. Les lipides dans la bicouche lipidique sont animés de mouvements : la diffusion latérale, rotationnelle et l'échange transversal (ou « flip-flop »). Adapté de : (Lipowsky and Sackmann, 1995).

I.1.4.2 Le nouveau modèle membranaire : les radeaux lipidiques

De nombreuses études réalisées ces dernières années ont amené les biologistes et biophysiciens à repenser le modèle original de mosaïque fluide et à entrevoir un aspect fonctionnel dans la dynamique et la diversité de composition des membranes. Même si l'hypothèse de Singer et Nicolson considérait la possibilité de l'existence de petits domaines membranaires (de 100 nm environ), ce modèle insistait davantage sur la fluidité de la membrane cellulaire, plutôt que sur l'attribution de fonctions biologiques spécifiques à des domaines lipidiques. De nombreuses études réalisées par la suite ont tenté d'introduire l'idée d'existence d'hétérogénéités latérales, de microdomaines lipidiques dans le modèle de structure et de dynamique de la membrane lipidique (Glaser, 1993; Jain and White, 1977; Vaz and Almeida, 1993). Elles ont conduit à cette nouvelle vision actuellement admise de la structure des membranes cellulaires, dans laquelle les lipides ne servent non plus seulement de solvant aux protéines membranaires, mais, grâce à une organisation latérale en domaines distincts – conséquence d'une grande variété d'espèces lipidiques présentant des propriétés physico-chimiques différentes (Figure I-9) – jouent également le rôle de plateformes de recrutement pour des protéines impliquées dans des événements cellulaires importants. Ces domaines particuliers de la membrane plasmique ont été appelés radeaux lipidiques (ou « rafts ») (Simons and Ikonen, 1997).

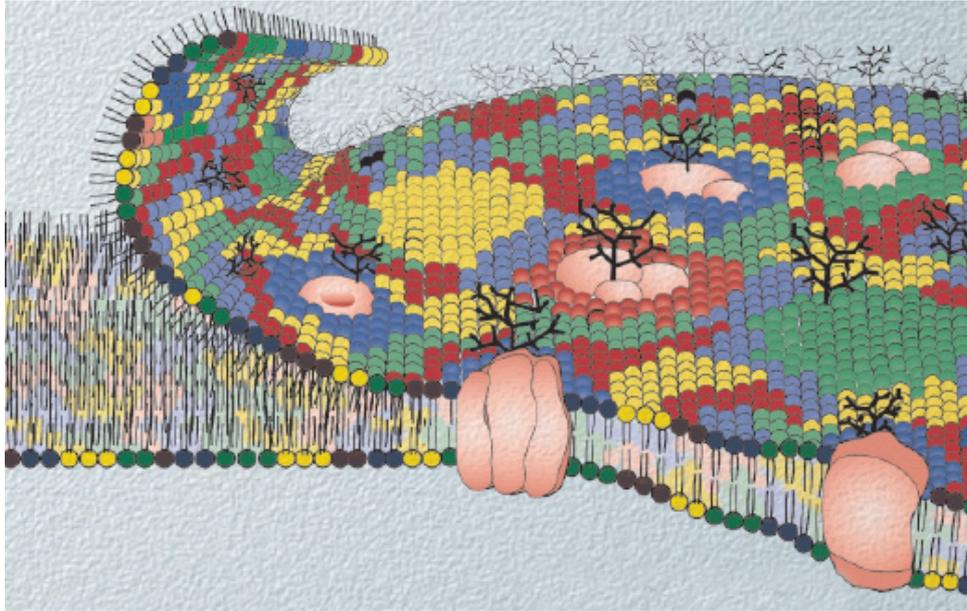


Figure I-9. Modèle représentant l'hétérogénéité des membranes biologiques. Les différentes espèces lipidiques sont représentées par des couleurs différentes. D'après (Edidin, 2003a).

I.1.4.2.1 L'hypothèse « radeau lipidique »

Les premières études ayant permis d'aboutir au concept de radeaux lipidiques concernent le trafic dans les cellules épithéliales polarisées. Basées sur des expériences de solubilisation de membranes par un détergent non ionique, ces études suggéraient que les glycosphingolipides et le Chol ségrégaient latéralement en domaines sur le plan de la bicouche, au niveau du feuillet exoplasmique de la membrane golgienne, pour servir de centres d'adressage à des protéines à ancre lipidique destinées au transport apical, avançant là un rôle possible pour cette organisation membranaire particulière (Brown and Rose, 1992; van Meer and Simons, 1988). L'hypothèse des radeaux lipidiques a été formulée par la suite par Simons et Ikonen (Simons and Ikonen, 1997). Selon cette hypothèse, les microdomaines enrichis en sphingolipides et Chol sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, allant du trafic membranaire et morphogénèse cellulaire à la transduction de signaux. Ces assemblages latéraux forment des radeaux dynamiques flottant dans un environnement riche en glycérophospholipides. Ces radeaux recrutent un ensemble spécifique de protéines membranaires, et en excluent d'autres. Une telle concentration et séparation de protéines différentes dans le plan de la membrane est le principe fondamental par lequel les radeaux membranaires sont supposés exercer leurs fonctions. Un modèle d'organisation des radeaux membranaires est schématisé dans la figure I-9.

I.1.4.2.2 Principe de formation des radeaux lipidiques

Le principe longtemps admis gouvernant la formation des radeaux lipidiques reposait essentiellement sur des interactions lipides-lipides. Ce fondement s'il reste d'actualité, n'est plus le seul admis aujourd'hui pour expliquer la formation des radeaux biologiques.

Les interactions lipides-lipides sont largement dépendantes des différences de propriétés physico-chimiques et de la structure des lipides membranaires. Considérons tout d'abord les propriétés physico-chimiques. Chez les sphingolipides, les fonctions amide et hydroxyle du squelette sphingosine peuvent agir à la fois comme donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène. Les glycérophospholipides en revanche, avec deux groupes carbonyle dans cette région, ne possèdent que des caractéristiques d'accepteurs de liaisons hydrogène. Ces différences offrent la capacité aux seuls sphingolipides de créer à la fois des liaisons intramoléculaires et intermoléculaires (Ramstedt and Slotte, 2002). Des études de RMN (Résonance magnétique nucléaire) ont ainsi révélé que les SMs étaient capables de former des liaisons hydrogène intramoléculaires relativement fortes entre l'hydroxyle de la sphingosine et l'oxygène de l'ester phosphate de la tête polaire, pour des états à la fois monomériques et agrégés (Talbot et al., 2000). Par ailleurs, un autre avantage que possèdent les sphingolipides est leur capacité à établir également des liaisons hydrogène entre les carbohydrates des têtes polaires. Finalement, comme les phospholipides ils possèdent aussi la capacité de créer des interactions de van der Waals (Ramstedt and Slotte, 2002). Tout ceci résulte en des forces d'interactions plus importantes entre les chaînes de sphingolipides qu'entre celles des glycérophospholipides et donne lieu à une cohésion latérale et une tendance à se regrouper plus grandes pour les sphingolipides.

Si l'on se place du point de vue de la structure des lipides, la seconde raison de la ségrégation des sphingolipides dans les membranes est la différence en longueur et en saturation des chaînes acyles des lipides. La longueur de l'acide gras greffé sur la fonction amide se situe entre 16 et 24 atomes de carbone pour la SM (Barenholz, 1984), alors que les chaînes acyles des glycérophospholipides sont généralement plus courtes (16 à 20 atomes de carbone pour la PC). Les différences en saturation sont encore plus drastiques. En moyenne les SMs contiennent 0.1-0.35 double liaison *cis*-insaturée par opposition à la PC qui présente 1.1-1.5 double liaison *cis*-insaturée par molécule. Cette double liaison donne naissance à une structure coudée dans la chaîne acyle (Ramstedt and Slotte, 2002). La position et le nombre de telles doubles liaisons affectent grandement les interactions avec les autres composants membranaires, comme les stérols ou les protéines. Lorsque rarement une double liaison se

présente dans la structure des SMs naturelles, elle est généralement éloignée de la région à l'interface (exemple de l'acide nervonique 24:1^{cisΔ15}), et n'a pas d'incidence majeure sur les interactions avec les lipides avoisinants. Ainsi la longueur et la saturation des sphingolipides les conduisent à se regrouper préférentiellement.

La formation des radeaux lipidiques fait intervenir un autre composant membranaire important : le Chol. Les interactions avec le Chol sont dictées en grande partie par la capacité des chaînes acyles des lipides à s'apparier avec le squelette rigide cyclique du Chol. Elles sont très sensibles à la longueur et au degré d'insaturation des chaînes acyles des lipides. De ce fait les interactions avec les sphingolipides à longues chaînes saturées sont favorisées au détriment des phospholipides à chaînes insaturées plus courtes (Smaby et al., 1996). De plus des liaisons hydrogène peuvent se mettre en place entre le groupe hydroxyle du Chol et la céramide des sphingolipides (Ramstedt and Slotte, 2002). L'ensemble de ces interactions conduit à une préférence d'association moléculaire du Chol pour les sphingolipides. Cette étroite association participe à la ségrégation des glycosphingolipides et du Chol en domaines lipidiques.

Du point de vue de l'emplacement du Chol dans la bicouche lipidique, il est postulé que le Chol vient remplir l'espace libre qui tend à se former au-dessous des têtes polaires et entre les chaînes hydrocarbonées saturées des sphingolipides, dans une direction perpendiculaire à la bicouche (Yeagle, 1985). Son effet est d'augmenter le degré d'ordre des chaînes acyles et de diminuer l'aire par molécule. De cette façon, il contribue à rigidifier les chaînes acyles flexibles tout en ne perturbant pas la diffusion latérale des composants membranaires. Finalement grâce à cet ensemble d'interactions, les radeaux lipidiques présentent une structure particulière avec une rigidité et une densité moléculaire importante par rapport au reste de la membrane. Il faut noter toutefois que des phospholipides peuvent éventuellement participer à la formation de tels domaines s'ils possèdent des chaînes hydrocarbonées saturées.

Le principe de formation des radeaux basé sur les interactions lipides-lipides supposait que les protéines s'associant aux radeaux s'inséraient dans un environnement lipidique particulier préexistant. Ce modèle a quelque peu évolué pour tenir compte des interactions lipides-protéines et protéines-protéines dans la formation des radeaux membranaires (Anderson and Jacobson, 2002). Les protéines adressées aux microdomaines membranaires s'associeraient avec un petit nombre de lipides spécifiques formant alors une couche de

lipides autour des domaines de la protéine ancrée dans la membrane, appelée « lipid shell » (Figure I-10). Ces protéines entourées d'une « carapace de lipides » pourraient ensuite se regrouper et former de cette façon des domaines de plus grande taille qui correspondraient à des radeaux. Des protéines de faible affinité pour les radeaux pourraient également, par des interactions protéines-protéines, être sélectionnées dans ces domaines (Helms and Zurzolo, 2004).

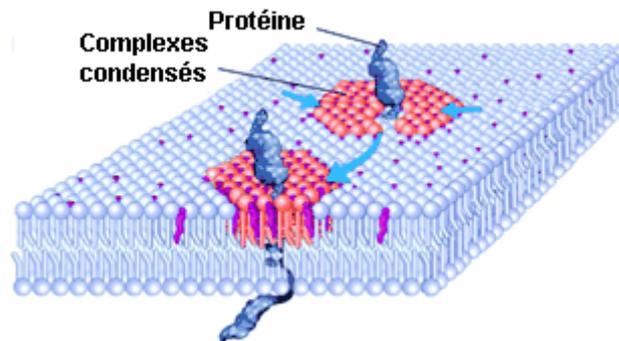


Figure I-10. Mécanisme de formation du “lipid shell”. Le Chol (en violet) et les sphingolipides (en rouge) s’auto-assemblent pour former des complexes enrichis en Chol. Le modèle propose que chaque protéine interagisse de façon dynamique avec au moins deux complexes (flèches bleues), devenant ainsi entourée d’une « carapace de lipides ». D’après (Anderson and Jacobson, 2002).

L’existence de radeaux lipidiques au sein des membranes intracellulaires est actuellement discutée (Pike, 2006). S’il paraît clair que les membranes « affiliées » à la membrane plasmique (membrane du compartiment trans-golgien, membrane endosomale) sont susceptibles de renfermer des domaines lipidiques, la question peut se poser pour les membranes d’autres compartiments (mitochondries, réticulum endoplasmique...) compte tenu des proportions faibles des lipides entrant dans la composition des radeaux. Cependant, si nous considérons la capacité des céramides à s’associer et à stabiliser les radeaux membranaires (Wang and Silvius, 2003), il est permis de penser que des domaines puissent exister aussi au niveau du réticulum endoplasmique où les céramides sont synthétisés. De plus d’après Pike (Pike, 2006), il est très vraisemblable que des domaines « raft-like » soient présents au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Ceci suggérerait que la membrane plasmique ne possède pas le monopole des domaines membranaires.

I.1.4.2.3 Protéines associées aux radeaux lipidiques

Bien qu'une grande fraction des protéines membranaires soit retrouvée dans la phase fluide environnant les radeaux, de nombreuses protéines se répartissent préférentiellement dans les domaines radeaux lipidiques. Les premières protéines dont la localisation a été assignée aux radeaux ont été les protéines à ancre GPI, déjà citées, et le déterminant responsable de leur répartition a été désigné comme étant la partie glycolipidique par laquelle elles sont reliées au feuillet exoplasmique (Brown and Rose, 1992; Chatterjee and Mayor, 2001). Des exemples typiques d'autres protéines localisées dans les radeaux sont les protéines palmitoylées et myristoylées comme les flotillines (Rajendran et al., 2003), les protéines kinases de la famille Src (par exemple Yes, Lyn, Fyn), doublement acylées et ancrées dans le feuillet cytoplasmique (Simons and Toomre, 2000), ou encore les protéines liant le Chol telles que les cavéolines (la cavéoline-1 en particulier). Celles-ci sont les protéines structurales majeures à l'origine de la formation des cavéoles (Figure I-11).

Les cavéoles sont définies comme des invaginations de la membrane plasmique de taille comprise entre 25 et 150 nm (Thorn et al., 2003), présentes dans un grand nombre de cellules. Elles ont été identifiées dans les années 50 dans des cellules endothéliales sur la base de leur morphologie (Palade, 1953; Yamada, 1955) et sont impliquées notamment dans les mécanismes d'endocytose et transcytose. La cavéoline-1 se lie fortement au Chol. Cette propriété, ainsi que la palmitoylation multiple au niveau de la région carboxy-terminale, est mise en avant pour expliquer la localisation des cavéoles au niveau des radeaux lipidiques (Kurzchalia and Parton, 1999). Les cavéoles constituent les domaines « rafts-like » d'origine, et restent à ce jour le seul type de radeaux morphologiquement identifiable. A l'origine, les cavéoles ont été isolées grâce à l'extraction des cellules par un détergent non ionique : le Triton X-100. Une variété de protéines (cavéoline, protéines à ancre GPI, protéines impliquées dans la transduction des signaux) a été retrouvée associée à ces structures isolées après l'action du détergent. L'identification de protéines de signal dans ces préparations a conduit à l'hypothèse selon laquelle ces domaines étaient intimement liés au processus de transduction de signal (Simons and Toomre, 2000; Smart et al., 1999). En utilisant une méthode pour la préparation des cavéoles, Schnitzer et collaborateurs (Schnitzer et al., 1995) ont montré que ces dernières pouvaient être séparées des structures isolées par les détergents et contenant les protéines à ancre GPI. Ceci a permis d'établir que les structures obtenues après action du détergent comprenaient en fait au moins deux types de domaines : ceux

contenant la cavéoline (les cavéoles); et ceux n'en contenant pas, nommés radeaux lipidiques. Les cavéoles représentent finalement une sous-classe de radeaux lipidiques.

Des motifs au niveau des protéines peuvent être nécessaires à l'association de protéines avec les radeaux. Ainsi, l'association de la protéine hémagglutinine (HA) du virus de la grippe aux radeaux semble une propriété intrinsèque de son domaine transmembranaire (Figure I-11). Le remplacement de celui-ci ou la modification d'acides aminés le composant par mutation entraîne la perte de cette propriété (Scheiffele et al., 1997).

Enfin, la taille du domaine transmembranaire pourrait également influencer la répartition des protéines dans les domaines membranaires de type radeaux ou « non-radeaux ». La bicouche lipidique au niveau des radeaux est en effet plus épaisse. Cette caractéristique est due à l'enrichissement en SM et plus généralement en sphingolipides dont les chaînes grasses sont majoritairement longues et saturées. L'association de protéines avec des microdomaines membranaires pourrait donc être favorisée par un domaine transmembranaire plus long (Munro, 1995).

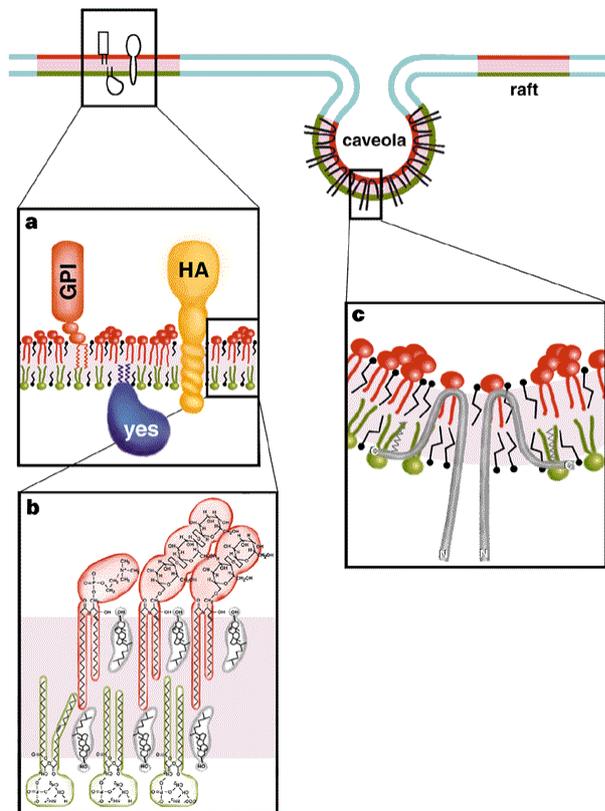


Figure I-11. Modèle d'organisation des radeaux lipidiques et cavéoles dans la membrane plasmique. Les radeaux (en rouge) ségrégent à partir des autres régions (en bleu) de la bicouche. (a) Des protéines sont localisées dans les radeaux. Elles y sont rattachées grâce à des ancres GPI, des chaînes acylées (exemple ici de la protéine Yes de la famille des kinases Src), ou grâce à un domaine transmembranaire spécifique (protéine hémagglutinine HA du virus de la grippe). (b) La bicouche lipidique au niveau des radeaux est asymétrique avec un enrichissement en SM et glycosphingolipides (en rouge) dans le feuillet exoplasmique, et un enrichissement en glycérophospholipides (en vert) dans le feuillet cytoplasmique. Le Chol (en gris) est présent dans les deux feuillets. (c) Les cavéoles sont formées par l'auto-assemblage des molécules de cavéoline. La localisation des cavéoles au niveau des radeaux lipidiques est le résultat d'interactions avec le Chol, et l'acylation des cavéolines en C-terminal. D'après (Simons and Ikonen, 1997).

I.1.4.2.4 Asymétrie entre les feuillet exoplasmique et cytoplasmique

Un aspect important de la structure des membranes cellulaires est la distribution asymétrique des lipides entre les feuillet exoplasmique et cytoplasmique. Comme nous l'avons vu les sphingolipides sont le plus représentés dans le feuillet externe, aussi il est légitime de se demander si une hétérogénéité lipidique existe aussi dans le feuillet interne et comment celui-ci interagit avec les radeaux enrichis en sphingolipides et Chol du feuillet sus-jacent. La question de l'existence des radeaux lipidiques sur le feuillet interne reste ouverte à l'heure actuelle. Des études récentes évoquent la possibilité de l'existence d'une organisation équivalente en domaines au niveau du feuillet cytoplasmique, mais les propriétés du feuillet interne ne sont pas encore clairement définies (Parton and Richards, 2003). Il est possible que les longues chaînes d'acides gras des lipides du feuillet exoplasmique interdigitent partiellement dans le feuillet cytoplasmique, ce qui pourrait avoir comme conséquence de favoriser dans la zone correspondante du feuillet interne, des phospholipides de nature saturée ainsi que les sphingolipides présents dans ce feuillet. Ici aussi, le Chol pourrait jouer un rôle en remplissant les espaces entre les chaînes, et en augmentant ainsi la rigidité moléculaire (Harder and Simons, 1997). Finalement en influençant la composition et les propriétés du feuillet interne, des domaines lipidiques pourraient aussi s'y former et une connexion entre les deux feuillet au niveau des domaines pourrait s'établir. Il est également proposé que des protéines transmembranaires stabilisent ce couplage (Devaux and Morris, 2004). Ainsi des protéines reconnues comme étant distribuées dans les radeaux ont été décrites comme participant à la stabilisation via des interactions transmembranaires. Citons par exemple la protéine à ancre GPI liée au feuillet externe PLAP (Placental alkaline phosphatase), et la protéine kinase tyrosine Fyn diacylée et ancrée dans le feuillet interne (Harder et al., 1998). Mais comment les deux protéines interagissent à travers la membrane, et comment les informations physiologiques sont transmises d'une face à l'autre de la membrane restent des questions ouvertes.

Dans une revue, Subczynski et Kusumy (Subczynski and Kusumi, 2003) proposent un modèle de radeaux assez élaboré pour le feuillet externe et le feuillet interne. Leurs conclusions principales s'opposent à l'idée de radeaux symétriques. Les tailles et durées de vie des radeaux sur les deux feuillet des membranes biologiques seraient très différentes, et n'autoriseraient seulement que des interactions croisées brèves. Le feuillet externe présenterait des radeaux petits et instables, contenant seulement quelques protéines, avec une

durée de vie de l'ordre de la milliseconde. Ces petits radeaux formeraient néanmoins des domaines plus grands et plus stables après activation de récepteurs et oligomérisation des protéines. La durée de vie de ces domaines serait de l'ordre de quelques minutes. Le feuillet cytoplasmique, quant à lui, n'aurait que des radeaux instables de petite taille, d'une durée de vie très courte, chacun renfermant possiblement une molécule parmi les molécules effectrices situées en aval.

Les phénomènes de transduction des signaux illustrent bien l'importance de cette communication entre feuillet externe et interne. Celle-ci serait permise par le rassemblement au niveau des radeaux de tous les éléments de la machinerie de signalisation et autoriserait le couplage entre les événements cellulaires extérieurs et les voies de signalisation à l'intérieur de la cellule. Cette intervention des radeaux dans les phénomènes de transduction a été suggérée comme étant une de leurs fonctions les plus importantes (Simons and Ikonen, 1997), elle est reprise plus en détails dans le paragraphe suivant.

I.1.4.2.5 Importance biologique des radeaux membranaires

Les radeaux membranaires ont été décrits comme étant impliqués dans une grande variété de processus cellulaires, tels que le trafic membranaire, la transduction des signaux. Ils interviennent également dans l'infection par certains pathogènes ainsi que dans les mécanismes conduisant à certaines maladies neurodégénératives. Des exemples illustrant le rôle important des radeaux membranaires dans ces processus biologiques sont exposés ci-dessous et résumés dans la figure I-12.

1. Rôle dans la transduction des signaux dans les cellules hématopoïétiques

De nombreuses preuves du rôle fonctionnel des radeaux lipidiques proviennent d'études sur les cellules hématopoïétiques. Bien que celles-ci jouent des rôles distincts dans la réponse immunitaire, les voies de signalisation empruntées en réponse à la liaison d'antigènes partagent des caractéristiques communes. Les récepteurs immunitaires multi-chaînes des cellules hématopoïétiques incluent le récepteur à haute affinité de l'immunoglobuline E (Fc ϵ RI), le récepteur des cellules T (TCR), et le récepteur des cellules B (BCR). Ils peuvent interagir de façon directe avec l'antigène (cas des TCR et BCR) ou bien de façon indirecte (via le domaine Fc des anticorps). Mais dans chacun des cas, la liaison de l'antigène au récepteur enclenche toute une cascade d'événements, commençant par le regroupement des récepteurs, suivi du recrutement de protéines kinases activées de la famille Src et de protéines

de signal en aval, qui vont permettre d'accomplir la réponse cellulaire spécifique. Les récepteurs, une fois liés à leur antigène, seraient recrutés dans des radeaux lipidiques où ils se regrouperaient. La cascade signalétique y serait initiée ensuite grâce à l'activation des protéines de la famille Src dont on sait qu'elles sont présentes dans les radeaux de façon constitutive. Ainsi l'agrégation du FcεRI conduit à l'activation de la protéine kinase Lyn appartenant à la famille Src. Celle-ci initie une cascade de signalisation qui aboutit à la dégranulation. De la même façon, après l'engagement des TCR dans une synapse immunologique, les protéines kinases tyrosine Lck et Fyn deviennent activées et relaient la propagation du signal (Field et al., 1995; Horejsi, 2003).

On pense que la restriction de ces voies de signalisation aux microdomaines favoriserait l'accès des récepteurs activés à des protéines signaux particulières, et protégerait le complexe de signalisation de l'action d'enzymes comme les phosphatases membranaires, situées en dehors des radeaux, qui autrement pourraient affecter le processus de signalisation (Simons and Toomre, 2000).

2. *Rôle dans l'endocytose*

-Endocytose médiée par les cavéoles

Des travaux récents ont établi un rôle des cavéoles et des radeaux lipidiques dans l'endocytose (Parton and Richards, 2003). En effet, le transfert de protéines à ancre GPI vers des cavéoles et leur endocytose consécutive ont été mis en évidence. De plus, des virus non-enveloppés, tels que le SV 40 (Simian Virus 40), utilisent les cavéoles comme portail pour entrer dans la cellule. La dynamine, une GTPase régulatrice impliquée dans l'endocytose, joue un rôle dans l'internalisation de ces structures. Une fois internalisées, les vésicules cavéolaires semblent délivrer les virus dans des organites récemment découverts : les cavéosomes (Pelkmans and Helenius, 2002). Ces structures cytoplasmiques ont un pH neutre, et sont enrichies en cavéoline de type 1, mais ne présentent pas les marqueurs des autres vésicules endocytiques. Parmi les autres composés connus pour être internalisés par une voie endocytique liée aux cavéoles et aux radeaux, nous pouvons également citer la toxine du choléra, l'acide folique ou encore le lactosylcéramide (Pelkmans and Helenius, 2002). Il est intéressant de noter que la déplétion du Chol redirige les composants des radeaux vers d'autres voies d'internalisation, démontrant la plasticité des mécanismes d'endocytose.

-Internalisation de protéines associées aux radeaux lipidiques indépendamment des cavéoles

D'autres voies d'internalisation dépendantes des radeaux ont été mises en évidence. Une nouvelle voie a ainsi été décrite, impliquant les radeaux et permettant l'internalisation des protéines à ancre GPI dans un compartiment nouvellement identifié dépourvu de cavéoline et de clathrine (l'endocytose médiée par la clathrine étant l'autre mode majeur d'internalisation) et ne faisant pas intervenir la dynamine. Ce compartiment est appelé compartiment endosomal précoce enrichi en protéines à ancre GPI (GEEC) (Sabharanjak et al., 2002). Il a été montré également que le récepteur à l'interleukine 2, un facteur de croissance lymphocytaire essentiel, était constitutivement associé aux radeaux lipidiques et utilisait un chemin indépendant de la clathrine et des cavéoles pour son internalisation. En revanche, le processus d'internalisation nécessitait dans ce cas l'activité de la dynamine (Lamaze et al., 2001). La raison de l'existence de ces nombreuses voies d'internalisation distinctes médiée par les radeaux lipidiques n'est pas connue. Par opposition, il a été démontré que certaines protéines associées aux radeaux membranaires étaient internalisées par endocytose dépendante de la clathrine, alors que cette voie exclut grandement les radeaux lipidiques (Nichols, 2003). Il est possible que les motifs d'endocytose portés par ces protéines prédominent dans le choix de la voie empruntée pour l'internalisation, de telle façon qu'ils empêchent les protéines de suivre un chemin d'internalisation médié par les radeaux (Stoddart et al., 2002).

3. *Rôle dans l'adressage dans les cellules épithéliales polarisées*

Les cellules épithéliales polarisées dirigent différentes molécules vers les membranes apicales et basolatérales. Comme nous l'avons vu, les radeaux lipidiques jouent probablement un rôle important dans ce trafic polarisé membranaire. Les protéines à ancre GPI ont été utilisées comme molécules de transport modèles pour comprendre la dépendance de l'adressage vis-à-vis des radeaux. Dans la majorité des lignées cellulaires épithéliales, les protéines GPI sont associées aux radeaux et dirigées vers la surface apicale (Harder and Simons, 1997). A l'origine, il avait été proposé que l'ancre GPI était responsable du ciblage apical de ces protéines. Toutefois, des résultats obtenus ensuite ont établi que bien qu'elles conféraient l'association aux radeaux, les chaînes acylées saturées de l'ancre glycolipidique seules n'étaient pas suffisantes pour déterminer l'adressage apical (Lipardi et al., 2000). Plus récemment, Paladino et collaborateurs (Paladino et al., 2004) ont démontré l'importance d'un

autre mécanisme dans le ciblage apical : l'oligomérisation des protéines. Ils ont proposé que cette étape supplémentaire d'oligomérisation basée sur des interactions protéines-protéines stabiliserait les protéines à ancre GPI dans les radeaux, et de ce fait serait requise pour l'adressage vers le pôle apical des protéines à ancre GPI.

4. *Rôle dans les maladies humaines*

-Encéphalopathies spongiformes transmissibles

L'agent responsable de ces maladies neurodégénératives fatales est une protéine : la protéine prion. Celle-ci est codée normalement par le génome. Une forme de la protéine prion cellulaire appelée PrP possède une ancre GPI et est localisée sur la face extracellulaire de la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques à la fois grâce à son ancre GPI et à l'extrémité N-terminale de son ectodomaine. Le mécanisme de transmission et de pathogenèse implique la conversion de la protéine PrP cellulaire normale en un isoforme scrapie appelé PrP^{Sc}. Des données indiquent que ce processus est initié et amplifié au niveau des radeaux lipidiques (pour revue, (Campana et al., 2005)).

-Infections virales

Nous venons de voir que le SV40 utilisait les cavéoles comme voie d'entrée. D'autres virus utilisent également les radeaux lipidiques pour accomplir différentes étapes du cycle viral. Par exemple, les protéines hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA), deux glycoprotéines de spicule des virus de la grippe de type A, sont associées aux radeaux lipidiques dans des cellules infectées (Scheiffele et al., 1997). De plus, lorsque les virus bourgeonnent à partir des cellules hôtes, ils acquièrent leur membrane à partir de celle de la cellule, et des analyses lipidiques du virus de la grippe ont démontré un enrichissement en lipides constitutifs des radeaux, indiquant que ces virus doivent bourgeonner à partir des domaines radeaux lipidiques (Takeda et al., 2003). Par ailleurs, une autre protéine virale, la protéine M est supposée participer au bourgeonnement du virus en se liant au domaine cytoplasmique des glycoprotéines. Ceci induit probablement un changement de conformation de cette protéine M conduisant à son oligomérisation. L'oligomérisation a non seulement pour effet de changer la courbure de la membrane nécessaire au bourgeonnement, mais également de regrouper les radeaux par l'intermédiaire des glycoprotéines de spicule. L'interaction des protéines M avec les protéines de spicule localisées dans les radeaux, et le regroupement des

radeaux suite à l'oligomérisation des protéines M apparaissent donc comme des événements clés dans le bourgeonnement de ce virus.

Un autre exemple de virus connu comme utilisant les radeaux au cours de son cycle est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, l'enveloppe du VIH est enrichie en lipides constitutifs des radeaux, et il est clairement établi qu'à la fois l'entrée et la sortie du virus sont dépendantes des radeaux lipidiques (Aloia et al., 1988; Fittipaldi et al., 2003; Ono and Freed, 2001).

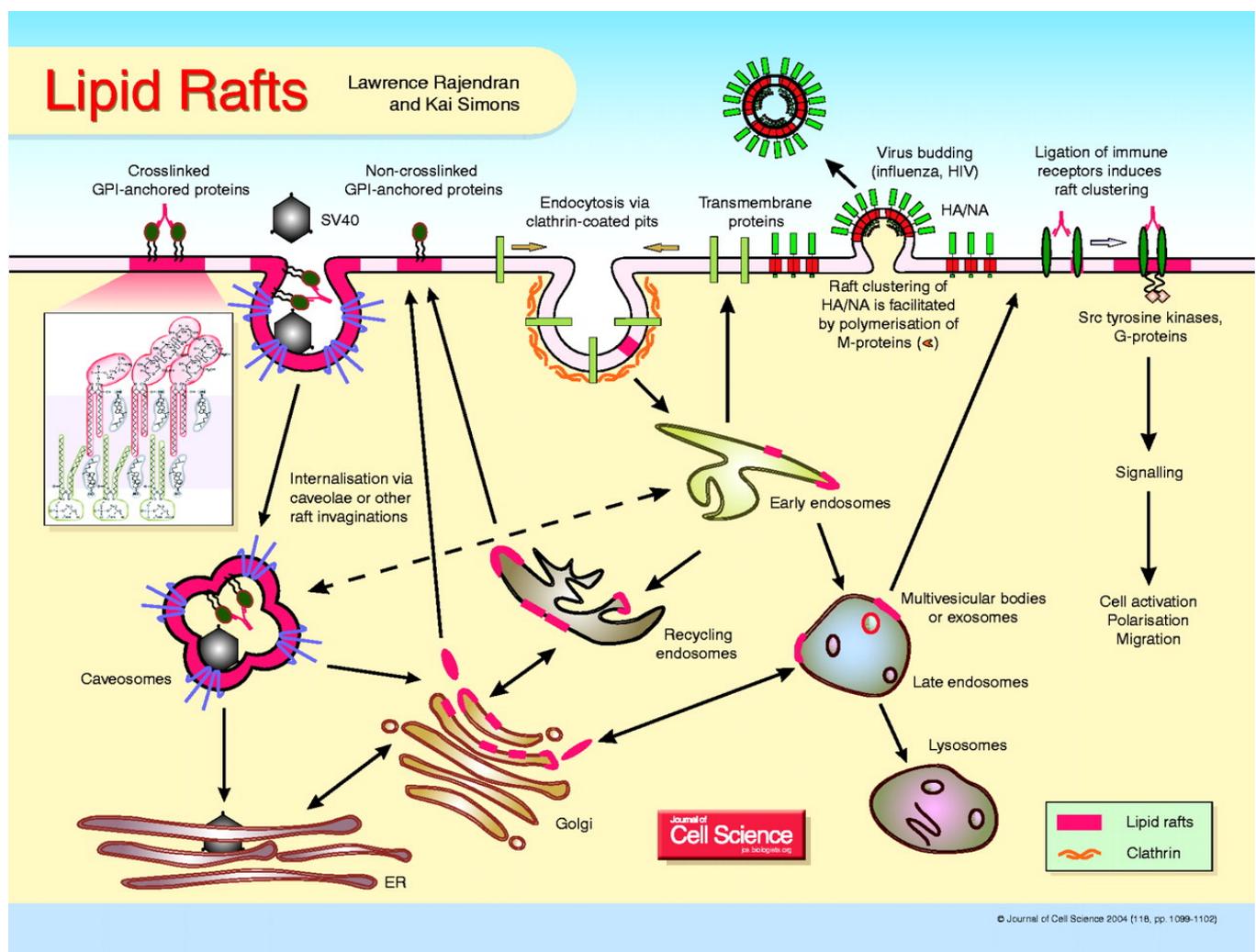


Figure I-12. Schéma général montrant les différents niveaux possibles d'implication des radeaux lipidiques dans les mécanismes cellulaires. Ils interviennent notamment dans les processus d'internalisation par endocytose, dépendante ou non des cavéoles ; dans les mécanismes d'adressage dans les cellules polarisées ; dans les phénomènes de transduction du signal au niveau des récepteurs immunologiques ; dans les étapes de l'infection par des pathogènes. D'après (Rajendran and Simons, 2005).

I.1.5 Mise en évidence et isolement des microdomaines membranaires provenant de membranes biologiques

I.1.5.1 Méthodes utilisant des détergents

I.1.5.1.1 Les détergents comme outils d'identification des radeaux membranaires

La méthode la plus largement répandue de mise en évidence des microdomaines est supposée à la fois appuyer l'existence des radeaux lipidiques et les isoler physiquement. Elle est basée sur le fait que le traitement de la membrane plasmique par le détergent non ionique Triton X-100 à 4°C induit la solubilisation d'une partie seulement des composants membranaires, l'autre partie, définie comme les radeaux membranaires, étant résistante (London and Brown, 2000). L'expérience consiste à exposer les cellules ou des membranes isolées à l'action du détergent, à les placer au fond d'un gradient de densité et à les soumettre à une centrifugation pour permettre la séparation des membranes résistantes aux détergents (appelées communément DRMs pour « Detergent-resistant membranes »), du matériel soluble. Ce dernier est retrouvé dans les fractions de haute densité tandis que les membranes non solubilisées se localisent dans les fractions de basse densité. Cette méthode fournit ainsi un moyen simple pour identifier les composants des radeaux.

La résistance de domaines membranaires au traitement par des détergents non ioniques a fortement influencé la formulation de l'hypothèse des radeaux lipidiques. En effet, les travaux réalisés par Brown et Rose en 1992 sur des cellules épithéliales ont permis d'étayer cette hypothèse établie plus tard. Cette étude (Brown and Rose, 1992) a indiqué qu'au niveau de l'appareil de Golgi, des protéines à ancre GPI destinées à l'adressage apical et associées à des lipides formaient des complexes résistants à la solubilisation par des détergents non ioniques. L'analyse des lipides de ces fractions résistantes a révélé un enrichissement en sphingolipides et Chol, ce qui venait supporter le modèle préalablement établi par Simons et van Meer (van Meer and Simons, 1988) selon lequel des lipides ségrégeraient en microdomaines avant de bourgeonner en vésicules et d'être adressés au pôle apical. Ainsi le concept d'assemblages de sphingolipides et de Chol fonctionnant comme des plateformes pour des protéines membranaires a été appuyé par l'observation de la résistance de ces assemblages à l'extraction par des détergents. La liaison entre ces complexes insolubles et les microdomaines enrichis en Chol et glycosphingolipides engagés dans l'adressage apical a ainsi été faite et un moyen simple d'isoler biochimiquement ces microdomaines mis à jour.

Depuis un grand nombre d'expériences ayant contribué à mettre en valeur le rôle des radeaux lipidiques dans les processus cellulaires est basé sur cette méthode (pour exemples, (Horejsi, 2003; Ono and Freed, 2001; Sabharanjak et al., 2002)).

Le Triton X-100 est le détergent le plus couramment employé, mais d'autres comme le Triton X-114, le Brij 96, le CHAPS, ou le Lubrol WX sont également utilisés pour solubiliser les membranes, et ont d'ailleurs conduit à une évolution du modèle des radeaux. Röper et collaborateurs (Roper et al., 2000) ont démontré que des DRMs différentes pouvaient être obtenues à partir de membranes de cellules MDCK (« Madin-Darby canine kidney »). La protéine prominine est associée à un domaine de la membrane du trans-Golgi et de la surface apicale qui est soluble dans le Triton X-100, mais insoluble au Lubrol WX. Dans des cellules hépatocytaires (HepG2), des radeaux résistants au Triton X-100 sont engagés dans une voie de trafic apical directe, alors que des radeaux Lubrol WX sont impliqués dans une voie de trafic apical indirecte (transcytose) (Slimane et al., 2003). Ces différentes classes de radeaux pourraient donc être impliquées dans des processus biologiques différents. L'analyse de la composition lipidique des DRMs obtenues en utilisant d'autres détergents que le Triton X-100, comme le Brij 58 ou le Lubrol WX montre des résultats très différents. Ils sont très peu enrichis en Chol et sphingolipides ainsi qu'en PC à chaîne saturée (Schuck et al., 2003). Ces différences sont interprétées comme des différences de sélectivité des détergents. L'emploi de différents détergents non ioniques a donc conduit à l'hypothèse de la coexistence dans les membranes de différentes sous-classes de radeaux pouvant avoir des fonctions biologiques différentes, les détergents étant un outil permettant de les différencier. En se basant sur la solubilisation différentielle des protéines, plusieurs modèles d'hétérogénéité membranaire ont été proposés (Pike, 2004):

1. Les radeaux contiennent un cœur de structure très ordonnée, et des zones moins ordonnées, chaque zone étant plus ou moins solubilisée par les différents détergents.
2. Les radeaux sont homogènes mais les détergents solubilisent de façon différentielle leurs constituants. Ce modèle signifierait que les sous-classes de radeaux sont un artefact induit par le détergent utilisé.
3. Les radeaux sont totalement hétérogènes et séparés les uns des autres et ne sont pas sensibles de la même façon aux détergents.

La possibilité d'isoler des domaines membranaires sur la base de leur traitement par des détergents a donné lieu à une nomenclature étendue pour désigner les radeaux lipidiques.

Ainsi dans la littérature, en plus de DRM, on pourra trouver les termes DIG, DIC, LDM, TIFF, entre autres (signifiant respectivement « Detergent-insoluble glycolipid-rich domain », « Detergent-insoluble complex », « Low-density membrane », « Triton X-100 insoluble floating fraction »). Cependant, il est important de rappeler que ces termes sont relatifs à une identification biochimique ou « opérationnelle » des radeaux (Edidin, 2003b), et valables pour différents détergents dont l'utilisation n'amène pas obligatoirement au même résultat. Ils désignent une fraction de membrane extraite expérimentalement à partir de ses caractéristiques physico-chimiques par un détergent donné. Le terme radeau lipidique indique lui le domaine fonctionnel natif présent au niveau des cellules vivantes. Si les DRMs apportent des informations très intéressantes pour l'étude des radeaux, ils ne représentent pas forcément les radeaux cellulaires. Ainsi, comme nous le verrons par la suite, la notion de radeau doit être envisagée différemment selon que l'on considère la définition opérationnelle ou la définition fonctionnelle ou encore la définition physique du domaine considéré.

I.1.5.1.2 Processus physico-chimique de solubilisation des membranes homogènes par un détergent

Les détergents, outils majeurs d'étude des membranes biologiques, sont des surfactants ayant la propriété de former des micelles. Grâce à leur forme moléculaire conique (Israelachvili et al., 1980), ces molécules amphiphiles ont une courbure spontanée positive, et ont par conséquent une tendance à former de petits assemblages lipidiques avec des surfaces fortement courbées : les micelles. Dans les mélanges contenant détergent et phospholipides, la coexistence de micelles pures de détergent et de bicouches de phospholipides pures est interdite du point de vue entropique. Aussi, pour de faibles concentrations de détergent, celui-ci est distribué entre le milieu aqueux et les bicouches de phospholipides planes, dans lesquelles les molécules « courbophiles » de détergent sont frustrées. Pour de plus hautes concentrations en détergent, les molécules « courbophobes » de phospholipides résident dans des micelles mixtes de détergents-lipides courbées, et sont à leur tour frustrées (Figure I-13).

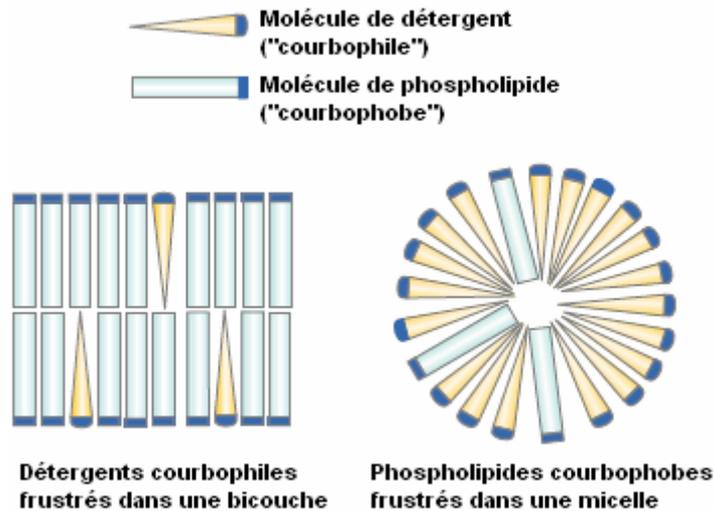


Figure I-13. Molécules de détergents et de phospholipides. En raison de leur géométrie, la plupart des phospholipides ont spontanément tendance à former des bicouches planes. On peut les qualifier de « courbophobes », par opposition à la plupart des molécules de détergents, dont la géométrie leur impose d’agréger en des micelles sphériques, et qui peuvent être décrits comme « courbophiles ». Les détergents et les phospholipides, respectivement dans les systèmes bicouches et micelles, y subissent une contrainte stérique. D’après (Lichtenberg et al., 2005).

La présence de détergent dans une membrane est souvent exprimée comme le rapport molaire effectif détergent/lipide (R_e). La valeur de R_e pour laquelle la membrane est saturée en détergent est R_e^{sat} . Au-delà de cette valeur critique, la solubilisation commence et il apparaît dans le système une coexistence de micelles mixtes détergents-lipides et de bicouches lipidiques saturées en détergent. La solubilisation complète des membranes a lieu lorsque R_e^{sol} est atteint. La solubilisation totale des membranes se produit donc quand $R_e \geq R_e^{sol}$, alors que pour $R_e^{sat} \leq R_e \leq R_e^{sol}$, des micelles mixtes et des membranes renfermant des molécules de détergent coexistent (Figure I-14) (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 2000). Les rapports critiques définissant le début et l’achèvement de la solubilisation (R_e^{sat} , R_e^{sol} respectivement) dépendent non seulement de la composition membranaire et de la nature du détergent utilisé, mais aussi des conditions expérimentales, notamment de la température et de la composition du milieu aqueux.

L’analyse des membranes par leur solubilisation sous la forme de micelles mixtes de détergents-lipides-protéines (Racker, 1972) a permis un grand progrès dans la biochimie et la biophysique membranaire. A des concentrations suffisamment élevées, chaque micelle mixte peut contenir une molécule de protéine. Ceci rend possible la purification de protéines membranaires, leur cristallisation et/ou leur reconstitution dans d’autres membranes de

composition définie, après suppression du détergent des solutions micellaires mixtes de détergents-lipides-protéines. Bien que de tels protocoles expérimentaux soient encore empiriques, les expériences basées sur cette stratégie ont sans aucun doute joué un rôle majeur dans la compréhension des membranes biologiques.

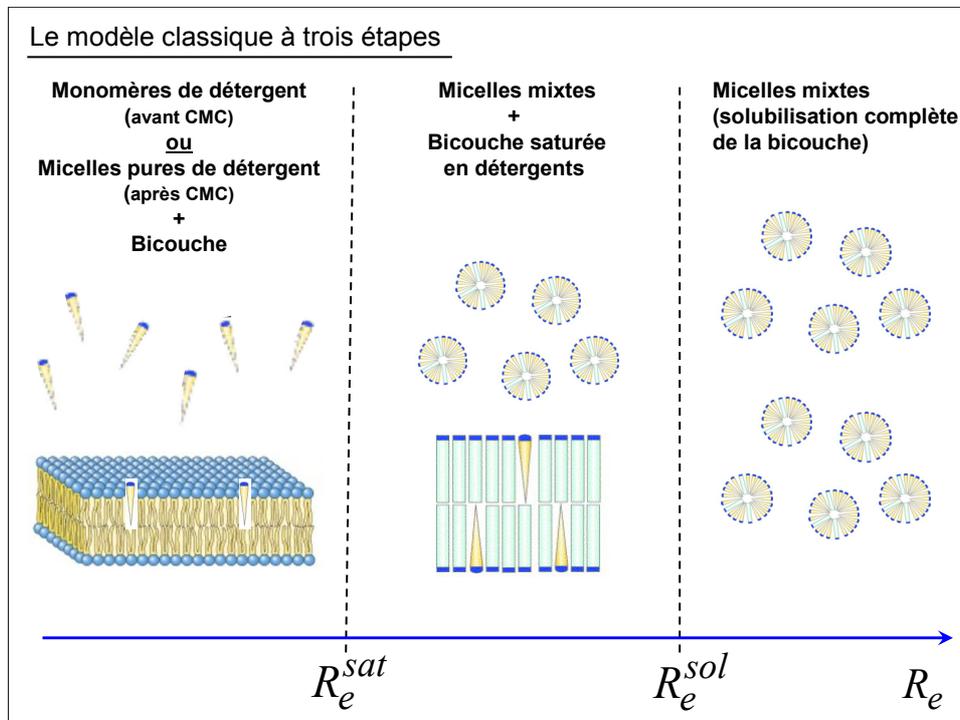


Figure I-14. Modèle à trois étapes de solubilisation d'une membrane homogène. Lorsque le rapport effectif détergents/lipides R_e^{sat} est atteint, la membrane est saturée en détergent. Entre R_e^{sat} et R_e^{sol} , une coexistence de micelles mixtes détergents-lipides et de bicouches lipidiques saturées en détergent apparaît dans le système. Au-delà de R_e^{sol} , la membrane est totalement solubilisée.

I.1.5.1.3 Limites de l'utilisation des détergents

Les radeaux membranaires sont le plus souvent définis opérationnellement en terme d'insolubilité au détergent Triton X-100. La corrélation entre DRM et radeau membranaire demeure cependant largement débattue (Edidin, 2003b; Lichtenberg et al., 2005; Munro, 2003). Un certain nombre de raisons s'opposent en effet à l'idée selon laquelle la présence d'une protéine dans les fractions membranaires insolubles aux détergents reflète exactement sa présence dans un radeau lipidique avant l'action du détergent. Lors du processus de solubilisation par les détergents, des réarrangements non physiologiques sont susceptibles d'avoir lieu.

Tout d'abord, les études d'extraction cellulaire par les détergents sont réalisées à froid. La baisse importante de température au moment de l'extraction peut donc potentiellement induire des altérations importantes dans l'organisation lipidique. De plus, parmi les expériences effectuées, peu d'entre elles ont exploré une gamme large de concentrations en Triton ou suivi la cinétique de solubilisation. Les rapports détergent/lipides membranaires sont en effet rarement contrôlés et définis. D'une expérience à l'autre, la quantité de matériel de départ utilisé dans l'extraction va donc considérablement évoluer et influencer les résultats. Pour exemple, McCabe et Berthiaume d'une part, et Wang et collaborateurs d'autre part ont chacun extrait des monocouches de cellules COS-7 intactes, avec du Triton à 4°C. Alors que les premiers ont décrit la protéine GFP-séquence N-terminale de Lck (GFP : « Green fluorescent protein ») comme totalement soluble, les seconds ont trouvé que 60% de la même construction étaient insolubles (McCabe and Berthiaume, 2001; Wang et al., 2001). La solubilisation différentielle de membranes en fonction du détergent utilisé est également un fait discutable comme cela l'a été mentionné. Quant aux protéines membranaires, leur isolement après traitement par détergent pourrait être effectué en fonction de leurs propriétés physiques, plutôt que de leur distribution latérale dans la cellule vivante. Enfin, il est envisageable que les DRMs représentent en partie une agrégation de la membrane consécutive à la lyse, et que donc il soit difficile de faire des comparaisons quantitatives entre les DRMs et les radeaux natifs.

Une approche intéressante pour comprendre ce qui se produit pendant l'extraction par des détergents a consisté à exposer des cellules à du Triton X-100 à froid, et à utiliser ensuite la microscopie au lieu du fractionnement après centrifugation pour examiner la distribution des composants membranaires des cellules traitées. Ceci a montré que la plus grande partie de la membrane plasmique demeurait intacte, avec une perte d'une quantité de protéines membranaires et l'apparition de « trous » dans la membrane (Hao et al., 2001). De tels résultats ne sont pas directement compatibles avec la notion de petits radeaux actuellement admise. Dans le même sens, Giocondi et collaborateurs (Giocondi et al., 2000) avaient proposé sur la base d'images *in situ* de membranes cellulaires traitées au Triton, obtenues par AFM (« Atomic force microscopy ») que les domaines membranaires s'arrangeaient en des fractions de membrane résistantes plus grandes après action du détergent. Une autre étude ayant éclairé ce sujet, a été l'analyse protéomique de fractions résistantes au détergent préparées après fractionnement (Foster et al., 2003). Cette expérience a été réalisée sur des préparations obtenues en parallèle à partir de cellules dans lesquelles le Chol avait été

supprimé afin d'empêcher la formation de radeaux, et à partir de cellules non traitées. Cette étude a montré que, comme attendu, de nombreuses protéines à ancre GPI et protéines G à ancre lipidique (réputées pour être localisées au niveau des radeaux) apparaissaient dans la fraction « radeaux » flottante de façon dépendante du Chol. En revanche, malgré la déplétion du Chol, un grand nombre de protéines ont également été retrouvées dans cette même fraction, suggérant donc que l'existence de ces fractions n'avait pas été affectée par la déplétion de Chol et que les protéines présentes dans ces fractions ne devaient pas se trouver dans des domaines dépendants du Chol.

I.1.5.2 Méthodes sans utilisation de détergents

I.1.5.2.1 La déplétion du Chol

La manipulation des constituants des radeaux lipidiques, le Chol en particulier, est également une approche utile dans la recherche sur les radeaux membranaires. Si cette méthode ne permet pas directement l'isolement des radeaux, elle est néanmoins utilisée pour confirmer l'association de protéines avec les radeaux et la détermination des fonctions des composants des radeaux. La déplétion du Chol s'effectue typiquement soit par l'action d'inhibiteurs de synthèse (lovastatine par exemple) combinée avec l'utilisation d'un milieu dépourvu de Chol, soit par l'extraction directe du Chol par des cyclodextrines (méthyl- β -cyclodextrine par exemple) ou encore par la séquestration du Chol par la filipine ou la nystatine (Simons and Toomre, 2000). L'utilisation de ces drogues permettrait d'empêcher la formation des radeaux. Les protéines associées aux radeaux deviennent donc solubles après l'action de détergents non ioniques. C'est le cas par exemple de la protéine HA du virus Influenza (Scheiffele et al., 1997), mais également de nombreuses protéines comme l'ont montré Foster et collaborateurs en comparant par spectrométrie de masse la composition protéique de DRMs isolées de cellules prétraitées ou non avec de la méthyl- β -cyclodextrine (Foster et al., 2003). Pour confirmer que les effets observés après déplétion sont bien liés à la diminution en Chol, le taux initial en Chol peut être rétabli à l'aide de complexes Chol exogène-cyclodextrines, et la restauration de la fonction biologique affectée par la déplétion peut être ainsi observée. La cyclodextrine est donc utilisée pour montrer l'implication des radeaux dans un processus biologique. Par exemple, la sous-unité B de la toxine de Shiga emploie une voie de trafic rétrograde pour pénétrer dans certains types cellulaires. Cette voie de transport serait dépendante des radeaux. L'utilisation de cyclodextrine inhibe l'association

de cette toxine avec les DRMs et bloque son trafic cellulaire, confirmant que les radeaux seraient employés par cette toxine pour pénétrer dans les cellules (Falguieres et al., 2001).

Un certain nombre de précautions doivent cependant être prises si on considère ces expériences. D'abord certains de ces agents sont également capables de perméabiliser les membranes. De plus, distinguer les radeaux sur la seule base de la sensibilité à la déplétion de Chol est une simplification. Le Chol est aussi présent dans les autres zones de la membrane où il est en fait plus accessible pour l'extraction. Aussi pendant le traitement, le contenu en Chol dans les radeaux et le reste de la membrane peut changer et l'équilibre être modifié (Ikonen, 2001). Enfin, l'utilisation de cyclodextrines ne permet pas systématiquement de rendre solubles des protéines associées à des DRMs (Foster et al., 2003), à l'exemple de la galectine 4 qui s'associant aux DRMs dans les entérocytes, reste associée à ces membranes lorsque les DRMs sont traitées par la cyclodextrine (Hansen et al., 2001). De façon intéressante, la galectine 4 a par ailleurs été impliquée dans la stabilisation d'un certain type de radeaux présents au niveau de cellules épithéliales intestinales : les « super-rafts ». Ceux-ci ont été définis après avoir isolé des fractions insolubles au Triton X-100 à 37°C au niveau de membranes de villosités intestinales, et sont caractérisés de plus par un enrichissement particulier en glycolipides. L'organisation basée sur la galectine 4 et les glycolipides expliquerait l'indépendance apparente de ce type de radeau vis-à-vis du Chol (Danielsen and Hansen, 2003).

Enfin, un problème majeur lié à cette approche est que si le Chol et les sphingolipides ont des fonctions au niveau de la membrane plasmique autres que celles de former des radeaux, alors la déplétion pourrait les affecter, et donc les conséquences ne seraient pas nécessairement dues à la perte des radeaux lipidiques. En effet, un certain nombre de rôles assignés au Chol et aux sphingolipides ne sont pas liés aux radeaux: la modification des propriétés physiques des membranes cellulaires comme la perméabilité, la fluidité, ou encore l'interaction avec des protéines spécifiques (Ohvo-Rekila et al., 2002; Ramstedt and Slotte, 2002).

I.1.5.2.2 Détection des radeaux lipidiques dans des membranes de cellules intactes

Du point de vue biologique, la méthode la plus directe et la plus significative pour la mise en évidence des radeaux demeure l'examen de la distribution des constituants des radeaux lipidiques dans des cellules vivantes non perturbées par des traitements aux détergents ou la suppression du Chol. Presque tous les efforts pour visualiser les radeaux dans

la membrane plasmique se sont donc portés sur l'observation de la concentration, au niveau de régions spécifiques, de molécules localisées possiblement dans les radeaux. Les cavéoles sont un des types de radeau le mieux stabilisé grâce à l'assemblage des molécules de cavéoline, associé au Chol et aux glycosphingolipides (Parton and Richards, 2003; Rothberg et al., 1992), et de ce fait peuvent être visualisées sur des membranes intactes. Cependant, l'obtention de données précises s'est avérée difficile, notamment à cause des limites de résolution dans le temps et dans l'espace des méthodes employées.

Les premières études appuyant le concept de radeaux dans les membranes intactes datent de 1998. Le pontage à l'aide d'anticorps de protéines présentes dans les radeaux a permis de regrouper ces radeaux en « clusters ». Ils ont alors atteint une taille suffisante pour être observés en microscopie à fluorescence. Dans cette étude, Harder et collaborateurs ont mis en évidence le regroupement (« clustering ») de différentes protéines connues pour être associées aux radeaux (PLAP, HA, Thy-1). Ces « clusters » colocalisaient entre eux ou avec le GM1, un glycolipide enrichi dans les radeaux. A l'inverse, un marqueur de membranes « non-rafts » comme le récepteur à la transferrine restait exclu des patches (Harder et al., 1998). Dans un grand nombre d'études décrivant la visualisation des radeaux dans les cellules utilisant la microscopie optique ou électronique, les protocoles impliquent donc des préparations pouvant induire l'induction du regroupement des molécules des radeaux. Ceci est la conséquence de pontage entre les molécules, résultant de l'utilisation d'anticorps, de la toxine cholérique (un agent pentavalent marqué artificiellement et reconnaissant le ganglioside GM1), de billes de latex conjuguées à des anticorps, de fixatifs, etc. (Harder et al., 1998; Pralle et al., 2000). De la même façon, l'emploi de basses températures pour certaines expériences résulte en une croissance artificielle des domaines (Schutz et al., 2000). Nichols (Nichols, 2003), par exemple, a détecté le regroupement du GM1 par l'utilisation de la technique d'imagerie de FRET (Transfert d'énergie de fluorescence), qui permet de détecter deux composés spatialement très proches. Cependant les complexes formés n'apparaissaient pas sous la forme de domaines distincts, mais étaient plutôt répartis sur toute la surface, excepté au niveau des puits de clathrine, à la résolution du microscope. Ceci indiquait donc que les complexes GM1, ou les domaines formés, étaient plus petits que la limite optique. Toutefois, compte tenu qu'un transfert d'énergie était détecté entre les molécules de toxine de choléra pentavalentes, un regroupement de GM1 devait se produire. Le plus souvent, les radeaux ont pu ainsi être visualisés seulement après le pontage de molécules ou à basse température. Ceci a mené à l'interprétation selon laquelle la taille des radeaux dans la cellule

devait être plus petite que la résolution optique (≈ 250 nm), et devait grandir après la stabilisation des molécules des radeaux par pontage ou diminution de la température (Maxfield, 2002). Ainsi, bien que les appréciations de la taille varient selon la méthode d'observation, la plupart des études ont convergé vers l'idée qu'effectivement, en l'absence de stimulation extracellulaire, la taille des radeaux devait être inférieure à 250 nm. D'autres estimations indirectes de la taille des radeaux lipidiques dans les cellules vivantes ont été permises par l'utilisation de techniques comme le « single particle tracking » (SPT, le suivi de particule unique) ou la microscopie photonique. Ces études ont mis en évidence des tailles de radeaux encore plus petites, de 50 à 200 nm (Dietrich et al., 2002; Sheets et al., 1997).

Par ailleurs, de nombreuses recherches se sont attachées à étudier la dynamique des constituants des radeaux. Des expériences de FRET et de RPE (Résonance para-électronique) (Kawasaki et al., 2001; Kenworthy et al., 2000) ont établi que les radeaux devaient être petits, avoir une durée de vie courte, et que les molécules des radeaux devaient diffuser rapidement à l'intérieur et à l'extérieur dans une échelle de temps de 100 μ s ou moins (Kusumi et al., 2004).

De récentes approches menées par des techniques utilisant des molécules uniques (SPT notamment) ont conduit à une nouvelle considération de la structure et de la dynamique de la membrane plasmique (Kusumi et al., 2005). L'équipe de Kusumi (Suzuki et al., 2001) a comparé le mouvement brownien de protéines à ancre GPI (CD59) localisées dans les radeaux, avec celui d'un glycérophospholipide di-insaturé typiquement « non-raft » (la DOPE). Ils ont mis en évidence la diffusion libre des protéines GPI et la DOPE dans des compartiments de 110 nm de diamètre, « sautant » d'un compartiment à un autre toutes les 25 ms. Ces résultats ont montré un comportement équivalent des deux classes de molécules alors qu'on s'attendait à une diffusion très ralentie des molécules des radeaux. Pour rendre cohérents ces résultats, les auteurs ont conclu qu'en l'absence de stimulation cellulaire, les radeaux lipidiques natifs devaient consister seulement en des complexes de quelques molécules hautement dynamiques, et stables pour quelques millisecondes. Confirmant ce dernier point, le pontage de la protéine à ancre GPI CD59 par un anticorps ou son ligand natif a entraîné un élargissement des radeaux avec un coefficient de diffusion environ 8 fois plus petit que celui des radeaux natifs. La protéine CD59 pontée s'est révélée dans ce cas fréquemment immobilisée et ces radeaux immobilisés ont été associés à l'actine (protéine du cytosquelette), et des kinases impliquées dans la signalisation. Pour expliquer ce comportement, les auteurs ont suggéré l'existence d'une compartimentalisation de la

membrane plasmique en des zones de 30 à 250 nm (leur taille dépendant du type cellulaire), composées de lipides et de protéines transmembranaires (Figure I-15). Chacune des molécules membranaires y suivrait une diffusion à court terme limitée à un compartiment, et subirait un transfert entre deux compartiments à plus long terme (« hop diffusion ») (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004). Le temps de résidence à l'intérieur d'un même compartiment serait de 1 à 25 ms dans le cas des phospholipides et de 3 ms à 1 s dans le cas des protéines transmembranaires. Etant donné que ces temps de résidence, en particulier ceux des lipides, sont souvent plus courts que le temps de capture d'une image en vidéo (33 ou 40 ms), les « hop diffusions » ne peuvent pas être facilement mises en évidence, et dans ces conditions une molécule membranaire subit la « hop diffusion » comme s'il s'agissait d'une simple diffusion brownienne. Une résolution dans le temps de 25 ms ou moins doit donc être nécessaire pour témoigner de ce comportement. En répétant de tels sauts et confinements temporaires, les molécules membranaires subiraient une diffusion macroscopique à travers plusieurs compartiments (Kusumi et al., 2004). Les frontières du compartiment seraient constituées d'une maille faite de cytosquelette d'actine (« la clôture ») ainsi que des protéines transmembranaires ancrées dans la membrane (« les piquets »). Ces compartiments membranaires sont à distinguer des zones de confinement transitoires (ou TCZ pour Transient confinement zones) définis par l'équipe de Jacobson (Dietrich et al., 2002; Simson et al., 1995). Les TCZ correspondraient à des domaines dans lesquels la diffusion des molécules serait ralentie et dans lesquels le temps de résidence de celles-ci serait plus long (de l'ordre de la seconde). De plus, les TCZ ne seraient pas nécessairement contigus, contrairement aux compartiments membranaires.

Tenant compte de tous ces résultats, Kusumi et collaborateurs (Kusumi et al., 2004) ont ainsi défini deux types de radeaux qu'il importe de distinguer :

- les radeaux petits, instables ou « radeaux de réserve », présents dans les cellules au repos et dont la taille serait plus petite que la limite de résolution d'un microscope ;
- les « radeaux stabilisés par le groupement de récepteurs » engendrés par la stimulation ou le pontage non-intentionnel de molécules préférant les radeaux, qui seraient constitués en plus de récepteurs groupés, de la coalescence de radeaux de réserve ou de complexes Chol-glycosphingolipides.

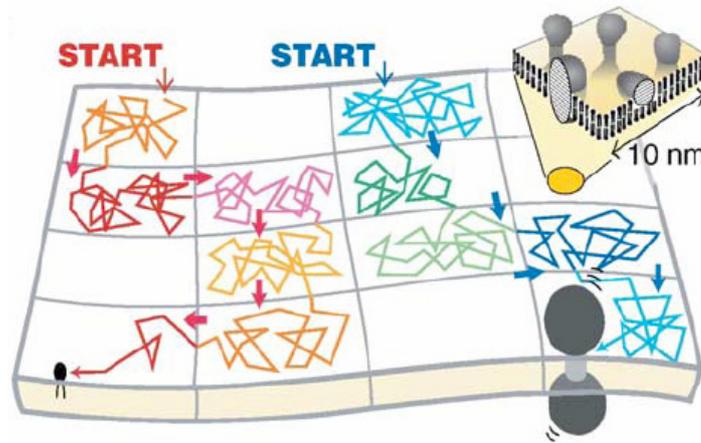


Figure I-15. Modèle de compartimentalisation de la membrane plasmique. De petits compartiments, dans lesquels protéines et lipides subissent une diffusion lente, s'étendent sur toute la surface membranaire. Le passage des molécules d'un compartiment à l'autre s'accomplirait toutes les 25 ms environ. D'après (Kusumi and Suzuki, 2005).

Dans une volonté de trouver un consensus parmi les divergences de point de vue sur les radeaux, une définition a été donnée aux radeaux membranaires cellulaires. Ils ont été décrits comme des domaines petits (10-200 nm), hétérogènes, hautement dynamiques, enrichis en stérols et sphingolipides et compartimentalisant les processus cellulaires. Les petits radeaux pourraient parfois être stabilisés en formant des plates-formes plus grandes grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides (Pike, 2006).

I.2 ...Aux membranes modèles

I.2.1 Définition

Un type particulier d'assemblage lipidique va nous intéresser au cours de ce travail : la vésicule lipidique. Elle représente une bicouche lipidique refermée sur elle-même formant ainsi une membrane qui sépare le milieu aqueux intérieur du milieu aqueux extérieur à la vésicule. Une grande variété de tailles et de formes est possible. Une bicouche est formée de deux monocouches de molécules lipidiques dans lesquelles les têtes polaires sont en contact avec de l'eau et les chaînes forment un cœur hydrophobe protégé de l'eau (Figure I-16).

Les membranes lipidiques modèles constituent un outil indispensable à l'étude des membranes biologiques malgré quelques déficiences inhérentes à leur statut de modèles telles

que la relative simplicité de leur composition, l'absence d'asymétrie de distribution des lipides ou encore l'impossibilité de représenter des interactions protéines-protéines. Le recours à des membranes modèles aux caractéristiques physico-chimiques définies permet d'approcher certains comportements élémentaires de la membrane biologique, ceci sera discuté plus en détails dans un prochain paragraphe.

On peut distinguer les vésicules constituées d'une seule bicouche lipidique, appelées unilamellaires, et les vésicules multilamellaires (MLVs pour « Multilamellar Vesicles ») en comportant un nombre plus grand. Parmi les vésicules unilamellaires, il est classique de distinguer trois gammes de taille : Les « Small Unilamellar Vesicles » (SUVs), ayant des tailles de 40 à 100 nm, les « Large Unilamellar Vesicle » (LUVs) avec des tailles allant de 100 nm à 1 μm et enfin les « Giant Unilamellar Vesicles » (GUVs) dont les tailles vont de 1 à 100 μm . Les GUVs sont les seules à pouvoir être observées optiquement et représentent le modèle membranaire le plus approprié pour mimer la membrane plasmique.

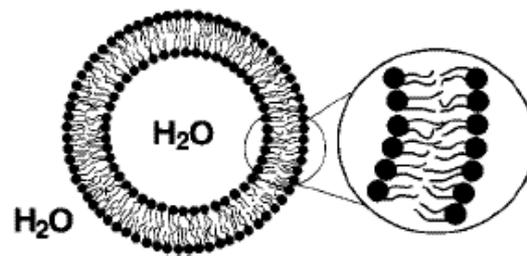


Figure I-16. Structure d'une vésicule unilamellaire. D'après (Menger and Angelova, 1998).

I.2.1.1 Les liposomes

Les liposomes, définis à l'origine comme des « lipid somes » ou corps lipidiques (Bangham, 1983), sont des vésicules phospholipidiques organisées en bicouche et contenant quelques μm^3 de solvant. Ils remplissent donc bien la condition de compartimentation et de ce point de vue se sont imposés comme un modèle extrêmement simple de cellules et membranes biologiques. Lorsque des protéines sont insérées dans leur matrice, on parle alors de protéoliposomes (Rigaud, 2002). Outre leur statut de modèle, les liposomes ont également trouvé des applications en cosmétologie (crèmes hydratantes, antioxydants...), en pharmacologie en tant que vecteur de principes actifs sous une forme adaptée à un adressage spécifique et optimisé auprès des cellules cibles (pour exemple, voir revue (Ebrahim et al.,

2005)). Ils ont également ouvert des perspectives alternatives à l'utilisation de vecteurs viraux en thérapie génique (Conwell and Huang, 2005).

Les liposomes SUVs et LUVs ont été intensivement et minutieusement étudiés, mais de par leurs dimensions, ils possèdent une courbure plus élevée que les membranes plasmiques et de ce fait, constituent des modèles assez éloignés de la cellule. Ils s'apparentent davantage à certains organites comme les vésicules de sécrétion, les lysosomes ou les endosomes. Différentes méthodes de préparation de liposomes existent, dont la plupart repose sur la propension naturelle des lipides à s'auto-assembler dans un milieu aqueux. L'agitation physique, causée par exemple par la sonication, ou la filtration à travers une membrane poreuse, facilite grandement le processus. Ces techniques se sont avérées nécessaires pour la préparation reproductible de populations de vésicules unilamellaires homogènes en forme et en taille. Néanmoins le résultat de ces préparations est souvent instable dans le temps.

I.2.1.2 Les vésicules géantes unilamellaires

Les vésicules unilamellaires GUVs de taille proche de la cellule ont ensuite attiré l'attention car elles constituent un système idéal pour l'observation directe par les techniques de microscopie optique (contraste de phase, fluorescence) des propriétés physiques et chimiques des membranes et pour leurs applications techniques. De nombreux travaux ont été consacrés à l'inventaire, des formes d'équilibre et aux propriétés mécaniques des GUVs (Lipowsky and Sackmann, 1995). Par ailleurs, les GUVs ont largement contribué à la compréhension des mécanismes d'action de nombreux agents biologiques, tels que des enzymes (phospholipase A2) (Sanchez et al., 2002; Staneva et al., 2004), l'ADN (Angelova and Tsoneva, 1999), des protéines virales (Nomura et al., 2004; Solon et al., 2005). Différentes méthodes pour obtenir des GUVs ont été longuement décrites dans la littérature. L'une de ces méthodes est basée sur l'hydratation d'un film de lipides séché par une solution aqueuse et pour une durée assez longue, en moyenne une trentaine d'heure (« méthode corse ») (Akashi et al., 1998). Une technique basée sur l'évaporation de solvant organique dans une solution aqueuse a été présentée par Moscho et collaborateurs (Moscho et al., 1996). Un des avantages de cette méthode est la courte durée nécessaire pour obtenir des GUVs. Une autre technique, introduite par Angelova et Dimitrov en 1986 (Angelova and Dimitrov, 1986), consiste à hydrater un film de lipides séché au-dessus de la température de transition de phase, et en présence d'un champ électrique (« méthode bulgare »).

I.2.2 La séparation de phase dans les bicouches lipidiques

I.2.2.1 Définition de la phase lipidique

Les lipides s'assemblent spontanément dans un milieu aqueux de façon à minimiser les contacts de leur partie hydrophobe avec l'environnement aqueux. Les arrangements des lipides entre eux diffèrent en fonction de la structure des lipides, et des conditions de température et d'hydratation. Ces agencements lipidiques, caractérisés expérimentalement par la dynamique des lipides qui les constituent ou l'organisation des chaînes acyles hydrophobes, sont qualifiés de phases lipidiques (Cullis and de Kruijff, 1979). Celles-ci sont constituées d'un grand nombre de molécules lipidiques.

La préférence de phase adoptée par un lipide est dictée par sa géométrie moléculaire, autrement dit par l'importance relative de ses parties hydrophobes et hydrophiles. Lorsque les parties hydrophobes et hydrophiles s'équilibrent c'est-à-dire occupent des volumes équivalents, les lipides peuvent être schématisés sous forme de cylindres et le type de phase adoptée est alors la phase lamellaire (L_{α}), correspondant à un empilement de bicouches phospholipidiques espacées par des couches aqueuses. En revanche, si la partie hydrophobe est plus importante que la partie hydrophile, une phase hexagonale est adoptée préférentiellement, et le lipide est représenté par une forme conique avec la tête polaire au sommet du cône. Les lipides en phase aqueuse hexagonale inversée ou H_{II} sont organisés sous forme de cylindres, constitués de canaux aqueux vers lesquels les têtes polaires convergent. Enfin si c'est la partie hydrophile du lipide qui est la plus importante, la phase adoptée est micellaire, et le lipide est représenté par un cône dit inversé avec la tête polaire à la base du cône. La figure I-17 récapitule différentes formes lipidiques assorties d'exemples, et les phases adoptées par ces lipides en fonction de leur forme.

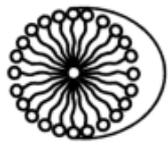
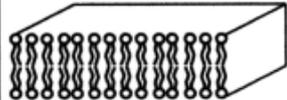
Lipid Species	Molecular Shape	Lipid Phase
Lysophospholipids Detergents	Type-I  + Inverted Cone / Wedge	 Micellar
Phosphatidylcholine Sphingomyelin Phosphatidylserine Phosphatidylinositol Phosphatidylglycerol	Bilayer-preferring  Cylinder	 Bilayer
Phosphatidylethanolamine Cl + Ca ²⁺ PA + low pH + Ca ²⁺ / Mg ²⁺ Monogalactosyldiglyceride Phosphatidic acid (PA) Unsaturated fatty acids Ceramide Diacylglycerol Cholesterol	Type-II  - Cone	 Hexagonal-II

Figure I-17. Différentes formes possibles des lipides membranaires et les structures d'auto-assemblage qui leur correspondent. Adapté de (Burger, 2000).

I.2.2.2 Séparation de phase et formation de domaines dans des bicouches lipidiques modèles

Les forces d'interaction entre les molécules lipidiques, relativement faibles, ont d'abord laissé penser que la distribution des lipides dans les membranes devait se faire de façon aléatoire et statistique. Il est très clairement admis aujourd'hui que le regroupement des lipides en domaines se produit et qu'il dicte en partie les propriétés des biomembranes. De nombreuses études réalisées sur des modèles membranaires ont permis d'approfondir la connaissance sur la séparation de phase et la formation de domaines au niveau des membranes lipidiques. Le terme de domaine est utilisé pour décrire la formation d'assemblages latéraux de lipides dans les membranes constituées d'un seul ou de plusieurs composants. Leur taille peut varier grandement, allant de quelques molécules à des étendues de lipides substantielles.

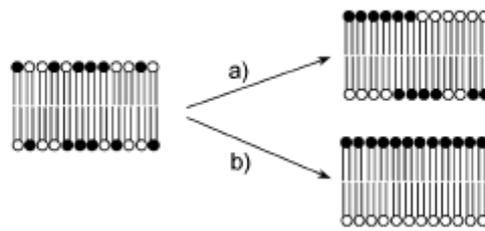


Figure I-18. Les deux principales séparations de phase rencontrées au sein d'une bicouche lipidique de composition binaire : a) séparation de phase latérale, b) séparation de phase verticale. D'après (Binder et al., 2003).

La figure I-18 illustre les effets de la ségrégation des lipides au sein d'une bicouche membranaire composée de deux lipides différents. Il existe au moins deux types de séparation de phase : i) les lipides au sein d'une même couche peuvent ségréger (séparation de phase latérale), engendrant la formation de domaines, et ii) les deux couches de la membrane peuvent adopter une composition lipidique différente (séparation de phase verticale). Chacun des deux processus se produit dans des systèmes naturels (cellules) et synthétiques (vésicules).

La séparation de phase latérale et la séparation de phase verticale peuvent se produire spontanément ou sous l'action de stimuli externes. Ces processus peuvent être couplés entre eux ou se produire séparément. Une grande variété de stimuli externes peut mener à la séparation de phase puis à une modification de la structure membranaire (Figure I-19). En principe, deux types différents d'interactions sont concernés dans l'établissement d'une séparation de phase: les forces entre les têtes polaires et les forces entre les chaînes lipidiques. Par exemple, un changement dans la valeur de pH externe aura pour conséquence de modifier la charge des têtes polaires ou l'hydratation, ce qui pourra diminuer les forces attractives entre deux têtes polaires voisines, causant alors une ségrégation de phase. Des ions (tels que Ca^{2+}), ou encore des polymères ioniques peuvent également mener à une redistribution des lipides, en raison soit de la formation de complexes entre les têtes polaires et les ions, soit de l'adsorption des polymères à la surface de la bicouche. Les forces agissant dans la région hydrophobe de la bicouche lipidique peuvent induire la séparation de phase d'une manière similaire. Ainsi, un changement de la température peut mener à la séparation de phase de deux lipides dont les températures de fusion sont différentes. La notion de température de fusion est fondamentale pour la compréhension des études de séparation de phase abordées ici, elle sera reprise dans la suite. De la même façon, des molécules qui pénètrent dans la bicouche peuvent

induire un réarrangement des molécules lipidiques en s'entourant d'une population de lipides spécifiques, conduisant à la formation de domaines (Binder et al., 2003).

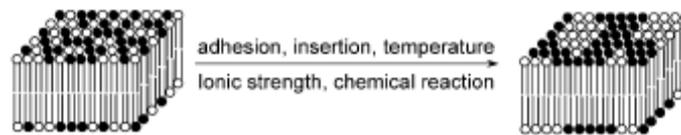


Figure I-19. Divers effets externes menant à la séparation de phase latérale dans une membrane composée de deux lipides. D'après (Binder et al., 2003).

I.2.2.3 Les phases gel L_{β} et fluide L_{α}

Lors de la reconstitution de membranes phospholipidiques *in vitro*, les différents états thermodynamiques des membranes ont pu être mis en évidence. En fonction de la température, on distingue: une phase lamellaire solide ordonnée ou phase gel (L_{β}), où les interactions de van der Waals entre les chaînes d'acides gras sont optimisées et où la diffusion translationnelle des lipides est très faible; une phase lamellaire fluide ou liquide désordonnée (L_{α}), où les niveaux d'entropie des chaînes d'acides gras et de diffusion translationnelle des lipides sont élevés (Mouritsen, 1991).

La température de transition de phase ou température de fusion (T_M , « melting temperature ») rend compte de la quantité d'énergie qu'il a fallu fournir pour rompre la haute cohésion moléculaire caractéristique d'un système membranaire dans un état ordonné. En cela, la T_M d'un lipide donné est la température à laquelle une membrane composée de ce seul lipide passe d'une phase solide ordonnée à une phase liquide désordonnée. La cohésion des ensembles membranaires est assurée par des liaisons de faible énergie tant au niveau des chaînes hydrophobes (interactions hydrophobes, liaisons de van der Waals), que des parties polaires (attractions électrostatiques, liaisons hydrogènes). Pour des lipides baignant dans le même environnement aqueux, la T_M varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras, ainsi que de la nature du groupement polaire. Pour des lipides ayant une même tête polaire, la T_M s'élève avec le nombre de carbones, car les interactions hydrophobes augmentent. En revanche, l'introduction de doubles liaisons (particulièrement celles en *cis*), écarte les chaînes les unes des autres, et diminue la T_M (Silvius et al., 1979). Ainsi, les températures de transition les plus basses sont associées avec les chaînes acyles les plus courtes et le degré d'insaturation le plus élevé, par exemple DOPC

(C18 :1), $T_M = -22^\circ\text{C}$; DMPC (C14 :0), $T_M = 24^\circ\text{C}$; DPPC (C16 :0), $T_M = 42^\circ\text{C}$. A chaînes carbonées identiques, la T_M pourra être considérablement modifiée par la nature des têtes polaires. Enfin, pour un même lipide, des variations de la T_M seront observées en fonction des propriétés physico-chimiques du milieu aqueux.

La surface occupée par un lipide dans le plan de la bicouche est fortement influencée par l'ordre des lipides dans la membrane. Ainsi l'aire de la tête polaire va varier de 40 à 60 Å² selon l'état de phase du lipide. Les aires sont plus petites lorsque la membrane est à l'état solide (gel), dans laquelle les chaînes sont bien ordonnées et adoptent de préférence une conformation *trans*. Une augmentation de l'aire occupée par les têtes polaires de 5-10 Å² est observée lors de la fusion menant à la phase liquide désordonnée. Comme on peut s'y attendre, l'épaisseur de la bicouche lipidique va dépendre de la longueur des chaînes (plus les chaînes sont longues, plus la bicouche est épaisse).

I.2.2.4 Origine de la séparation de phase

Supposons une membrane lipidique composée de deux lipides A et B. Le lipide A possède une température de transition de phase (T_A) inférieure à celle du lipide B (T_B). Si on considère un mélange lipidique de proportion 1:1 une phase liquide L_α et une phase gel L_β coexistent entre les températures de fusion des deux lipides (entre T_A et T_B). La phase liquide est enrichie en lipide dont la température de fusion est la plus basse (A), alors que la phase gel est enrichie en lipide dont la T_M est la plus élevée (B). Comme la glace dans l'eau liquide, les domaines gel flotteront dans l'environnement fluide. Il s'agit sans doute là du mode le plus simple de formation de domaines dans les membranes lipidiques. La miscibilité lipidique complète est atteinte au-dessus de la température de fusion du lipide B.

I.2.2.4.1 Influence des chaînes d'acides gras sur la séparation de phase

Une séparation de phase significative peut se produire même en présence de petites variations dans la structure lipidique. Un mélange de PCs avec différentes longueurs de chaînes en est un exemple classique. Le comportement non idéal de ce type de mélange est provoqué par le mésappariement hydrophobe des chaînes acyles puisque les têtes polaires sont identiques. Les auteurs (Knoll et al., 1991; Silvius et al., 1996) ont étudié les diagrammes de phase d'un même phospholipide en faisant varier systématiquement la longueur des

chaînes d'acides gras. La séparation de phase latérale est apparue quand les chaînes acyles différaient de quatre groupes CH_2 ou plus.

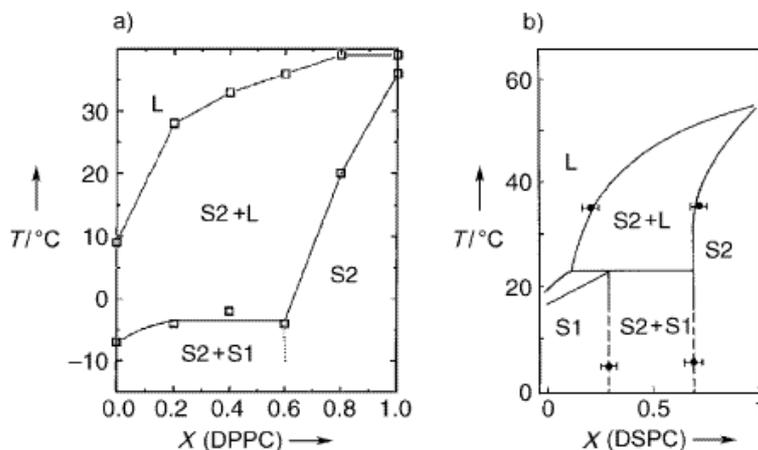


Figure I-20. Diagrammes de phase de DLPC/DPPC (a) et DMPC/DSPC (b). Il existe une différence de quatre groupes CH_2 entre chaque type lipidique dans chacun des mélanges. Une coexistence entre les phases liquide (L) et solide (S) apparaît dans les deux diagrammes. D'après (Knoll et al., 1991; Silvius et al., 1996).

Le diagramme de phase de la figure I-20 (a) montre le cas d'un mélange DLPC/DPPC (Dilauroylphosphatidylcholine (C_{12})/ Dipalmitoylphosphatidylcholine (C_{16})). Il existe une immiscibilité dans la phase solide qui mène à une séparation solide/solide de 0 à 60 mol% DPPC, et dans laquelle deux phases solides caractéristiques de chacun des deux phospholipides coexistent (séparation de phase gel (S1) et (S2)). Au-dessus de 60 mol% DPPC, la bicouche adopte préférentiellement la phase solide caractéristique du DPPC et la bicouche devient uniforme en structure. Des phases liquide et solide coexistent entre les températures de transition de phase des deux phospholipides et une miscibilité complète apparaît à l'état liquide. La figure I-20 (b) indique un comportement similaire pour des homologues lipidiques de DLPC et DPPC de deux unités CH_2 supplémentaires : DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholine (C_{14})) et DSPC (Distéroylphosphatidylcholine (C_{18})). Le diagramme montre cependant qu'à basse température une miscibilité des deux lipides existe jusqu'à 35 mol% de DSPC en phase gel (S1).

Lorsque ce sont les longueurs des chaînes d'un même lipide qui sont inégales, la formation de la bicouche doit impliquer l'interdigitation des chaînes pour mieux remplir l'espace, ce qui peut donner lieu à des phases différentes. Mason a réalisé une étude sur un mélange lipidique, consistant en un phospholipide symétrique (DSPC) et un phospholipide de

tête polaire identique, mais asymétrique c'est-à-dire dont les longueurs de chaînes sont différentes (C_{18} - C_{10} -PC) (Figure I-21) (Mason, 1988). L'une des deux chaînes perturbe la bicouche lipidique en raison de sa longueur plus courte de huit unités CH_2 , et mène à un comportement de phase particulier : trois immiscibilités différentes sont observées à l'état solide (S_1 , S_2 , S_3). Dans l'état solide S_1 , pour de faibles proportions du lipide asymétrique, une bicouche lipidique « normale » se forme, sans interdigitation ni compensation des défauts causés par le lipide asymétrique. En revanche, pour des concentrations supérieures à 50 mol% C_{18} - C_{10} -PC, deux phases apparaissent et coexistent : une phase S_2 où la bicouche lipidique est partiellement interdigitée, laissant des « trous » pour la DSPC symétrique, et la phase S_3 , consistant seulement en des C_{18} - C_{10} -PC dont les chaînes sont interdigitées.

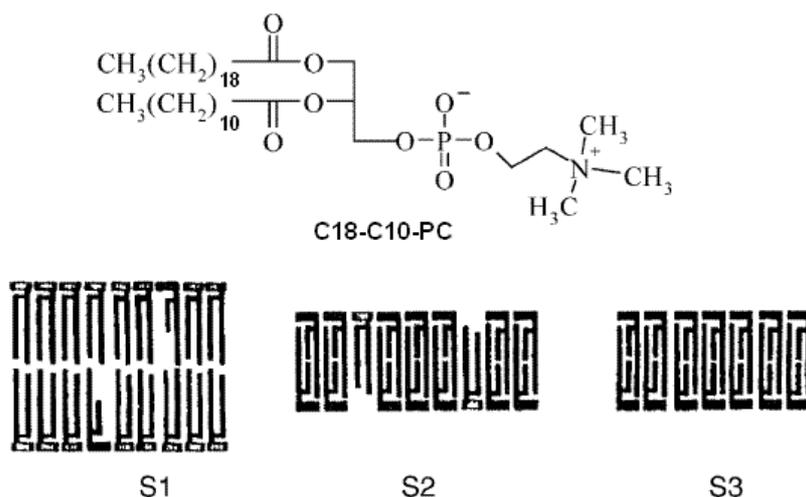


Figure I-21. Miscibilité du DSPC avec un phospholipide hautement asymétrique (C_{18} - C_{10} -PC). En fonction de la quantité du lipide asymétrique, trois différents types de phases solides sont observées. D'après (Mason, 1988).

En résumé, la longueur et le niveau d'ordre des chaînes acyles des différents lipides constitutifs d'une membrane vont influencer sur la partition latérale de ces lipides. Si la différence de taille des chaînes acyles de deux lipides en présence est très importante, il peut survenir un mésappariement hydrophobe entraînant une séparation de phase de façon à diminuer au maximum le niveau d'énergie du système : les lipides présentant des longueurs de chaînes compatibles se distribueront préférentiellement entre eux.

I.2.2.4.2 Influence de la tête polaire sur la séparation de phase

Les exemples les plus communs de formation de domaines impliquent des situations dans lesquelles les deux lipides diffèrent sensiblement. Ceci peut résulter : i) de différents types de têtes polaires, ii) de lipides dont la différence de température de transition de phase est très grande, iii) de mélanges de lipides avec du Chol.

1. *Mélanges de glycérophospholipides*

Silvius (Silvius, 1986) a publié des études de phase dans lesquelles les miscibilités de lipides de longueur de chaînes acyles identique mais de têtes polaires différentes ont été analysées. Des paires de lipides (chargé/neutre ou neutre/neutre) ont été comparées les unes aux autres (PS, phosphatidylsérine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PA, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine). La plupart des systèmes ont montré une immiscibilité solide/solide, et une miscibilité complète à l'état liquide. De plus une large région de coexistence de phase entre les phases liquides et solides a été mise en évidence, en raison de températures de transition de phase fortement différentes. Les auteurs en ont conclu que les différences chimiques entre les têtes polaires n'étaient pas assez significatives pour induire le phénomène de séparation de phase dans ces mélanges lipidiques lorsqu'ils sont à l'état fluide.

2. *Mélanges de glycérophospholipides/sphingolipides*

Les sphingolipides et les phospholipides (tels que DMPC ou DPPC) montrent une séparation de phase aussi bien à l'état solide qu'à l'état liquide. Ils partagent de plus une coexistence de phases entre les deux températures de fusion des lipides (Gardam and Silvius, 1989; Holopainen et al., 2001; Koynova and Caffrey, 1995). Les sphingolipides et les phospholipides possèdent des structures très différentes si on considère leurs têtes polaires et leurs chaînes hydrophobes, il en résulte une température de transition de phase plus élevée pour les sphingolipides (Boggs, 1987). Ceci explique les effets importants de séparation de phase latérale observés dans ce type de mélange binaire. Les sphingolipides montrent une cohésion latérale très forte à température physiologique. Comme nous l'avons vu dans la première partie de l'introduction, le regroupement préférentiel des sphingolipides entre eux est la conséquence de divers effets :

- La présence d'un groupement hydroxyle et d'un groupe amide dans le squelette sphingosine conférant à chaque molécule de sphingolipides la propriété d'agir à la fois en tant

que donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, les phospholipides ne pouvant être qu'accepteurs.

- L'établissement de liaisons hydrogène entre les têtes saccharidiques des glycosphingolipides.
- La différence en longueur et en degré de saturation des sphingolipides comparativement à celles des phospholipides dictant des interactions hydrophobes et de van der Waals plus fortes.

Au sein d'une membrane lipidique, les propriétés des sphingolipides vont donc les conduire à ségréger et à former des domaines enrichis en sphingolipides.

I.2.2.4.3 Cholestérol : action sur les glycérophospholipides et les sphingolipides

1. Glycérophospholipides/Cholestérol

Pour comprendre le mode d'action du Chol, référons-nous au diagramme de phase de la figure I-22 qui indique le comportement phasique d'une bicouche composée d'un mélange de DPPC-Chol.

Jusqu'à une concentration de 10 mol% Chol et pour une température allant jusqu'à 42°C, température de transition de phase de la DPPC, une phase solide ordonnée unique persiste. Au-delà de 10 mol% Chol, une nouvelle phase fluide apparaît : la phase l_o (phase liquide ordonnée). Jusqu'à 30 mol% Chol, la phase l_o coexiste en équilibre avec la phase solide S_o pour des températures inférieures à 42°C, et avec la phase l_d (phase liquide désordonnée) pour des températures supérieures à 42°C. La phase l_o seule persiste à des niveaux de Chol plus élevés, et on observe la disparition de la transition de phase du DPPC. Il n'y a donc plus de différence entre l'état liquide et l'état cristallin de la DPPC dans un mélange contenant plus de 30 mol% Chol. La phase l_o sera définie plus en détails dans la sous-partie I.2.2.5 qui suit.

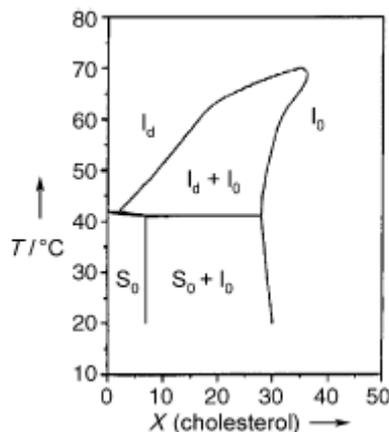


Figure I-22. Influence du Chol sur la structure de la bicouche lipidique composée d'un mélange DPPC-Chol. Une nouvelle phase apparaît pour des quantités de Chol supérieures à 10 mol% : la phase I_0 . La transition de phase disparaît pour des niveaux supérieurs à 30 mol% Chol, pour laisser place uniquement à la phase I_0 . D'après (Sankaram and Thompson, 1991).

Les interactions des glycérophospholipides avec le Chol diminuent dans l'ordre suivant : PC > PS > PE. Elles sont favorisées lorsque les chaînes aliphatiques sont pleinement saturées (Silvius, 2003).

2. *Sphingolipides/Cholestérol*

Les bases de l'interaction du Chol avec les sphingolipides et les phospholipides ont déjà été abordées précédemment. Brièvement, cette interaction repose sur la capacité des chaînes acyles lipidiques à s'apparier avec le squelette rigide hydrophobe du Chol. Les interactions hydrophobes et de van der Waals sont les meilleures lorsque les chaînes hydrophobes sont longues et dépourvues d'insaturation, ce qui favorise largement les sphingolipides. Ceux-ci ont de plus la particularité d'établir des liaisons hydrogène avec le groupement hydroxyle du Chol. Cependant, les phospholipides sont en mesure eux aussi de s'associer de façon étroite avec le Chol, en particulier lorsqu'ils sont saturés, et comme l'indique le diagramme de la figure I-22, ces relations conduisent sous certaines conditions à l'établissement d'une séparation de phase et à l'émergence d'une nouvelle phase lipidique fluide ordonnée dite I_0 .

Dans une membrane composée de phospholipides ou de sphingolipides, le Chol aura pour effet d'augmenter la rigidité membranaire tout en maintenant une mobilité latérale élevée. L'addition de Chol mène également à un important effet de condensation de la membrane, ainsi, ajouté à une bicouche de DPPC, le Chol réduit l'aire membranaire du DPPC de 61 à 47 \AA^2 (Smaby et al., 1994). Ce qui explique l'augmentation de la rigidité

membranaire. La mobilité latérale est cependant favorisée en raison des dimensions plus petites de la molécule de Chol par rapport à celles du DPPC.

I.2.2.5 La phase l_o

I.2.2.5.1 Propriétés

Des coexistences de phases fluides différentes peuvent donc être mises en évidence *in vitro* dans un système binaire composé d'un lipide à chaînes acyles saturées et de Chol (Sankaram and Thompson, 1991; Vist and Davis, 1990). Dans ce cas, au-delà d'une certaine concentration en Chol, une phase liquide ordonnée apparaît et se sépare de la phase liquide désordonnée au-dessus de la T_M du lipide considéré. De la même façon, au-dessous de la T_M de ce même lipide, une phase l_o se sépare de la phase gel lorsque la quantité de Chol membranaire est suffisante. Dans la phase l_o , les chaînes acyles des lipides ont des propriétés intermédiaires entre celles des phases L_α et L_β (Figure I-23). Elles sont allongées à leur maximum, comme dans la phase gel, mais présentent une mobilité latérale dans la bicouche lipidique analogue à celle de la phase liquide désordonnée, en effet le coefficient de diffusion latérale n'est diminué que d'un facteur 2 à 3 dans la phase l_o (Almeida et al., 1993).

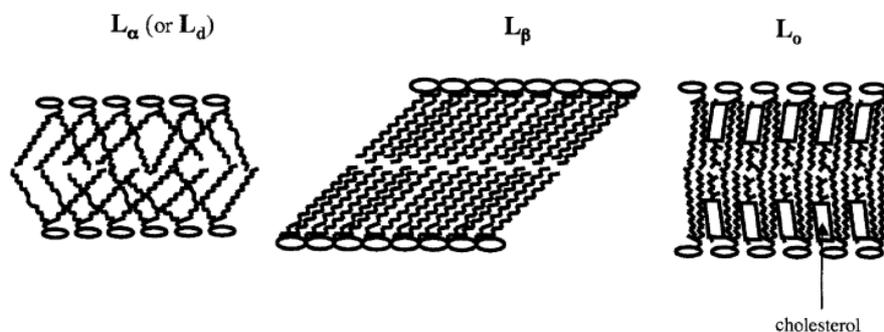


Figure I-23. Les différentes structures que peut adopter une bicouche lipidique. D'après (Devaux and Morris, 2004).

Dans la phase liquide désordonnée, les stérols contraignent, et en ce sens, ordonnent les chaînes acyles des phospholipides. Ceci résulte de l'effet de la structure moléculaire plane et rigide du Chol, qui impose une conformation ordonnée aux chaînes aliphatiques avoisinantes. Cette propriété du Chol a pour conséquence de diminuer le volume moléculaire occupé par les chaînes acyles des lipides en phase liquide désordonnée, en provoquant une augmentation de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche lipidique. Dans les phases gels, le Chol inhibe le compactage en configuration *trans* des chaînes des sphingolipides en

provoquant l'écartement des têtes polaires des lipides adjacents, ce qui a pour conséquence de diminuer le degré d'ordre des chaînes acyles des lipides présents dans cet état (Vist and Davis, 1990) (Figure I-23 et I-24). Dans les phases L_{β} , le Chol va en fait rompre l'ordre translationnel cristallin, mais sans perturber significativement l'ordre conformationnel.

En ce sens, le Chol tamponne la capacité des différents lipides à former des phases fluide et gel et conditionne l'apparition de la phase liquide ordonnée.

I.2.2.5.2 Mélanges ternaires

1. *Etudes de mélanges ternaires*

Des études, notamment celles de Silvius et collaborateurs (Silvius et al., 1996) et de Feigenson et Buboltz (Feigenson and Buboltz, 2001) ont également montré des immiscibilités liquide-liquide (l_o/l_d) dans des mélanges ternaires contenant du Chol et deux espèces différentes de PC, l'une ayant des chaînes acylées longues et saturées. Silvius et collaborateurs (Silvius et al., 1996) se sont intéressés en particulier à des mélanges de deux phosphatidylcholines présentant des températures de transition de phase très différentes (DLPC/DPPC, DOPC/SLPC) additionnées à du Chol. Ces mélanges ont montré une tendance augmentée pour la séparation de phase. Les mélanges binaires correspondant ont présenté une séparation de phase aux températures comprises entre les températures de fusion de chacun des lipides. L'addition de Chol à faibles taux a favorisé la séparation de phase, conséquence d'interactions favorables avec les chaînes plus longues de DPPC. Cet effet diminue à des concentrations plus élevées de Chol.

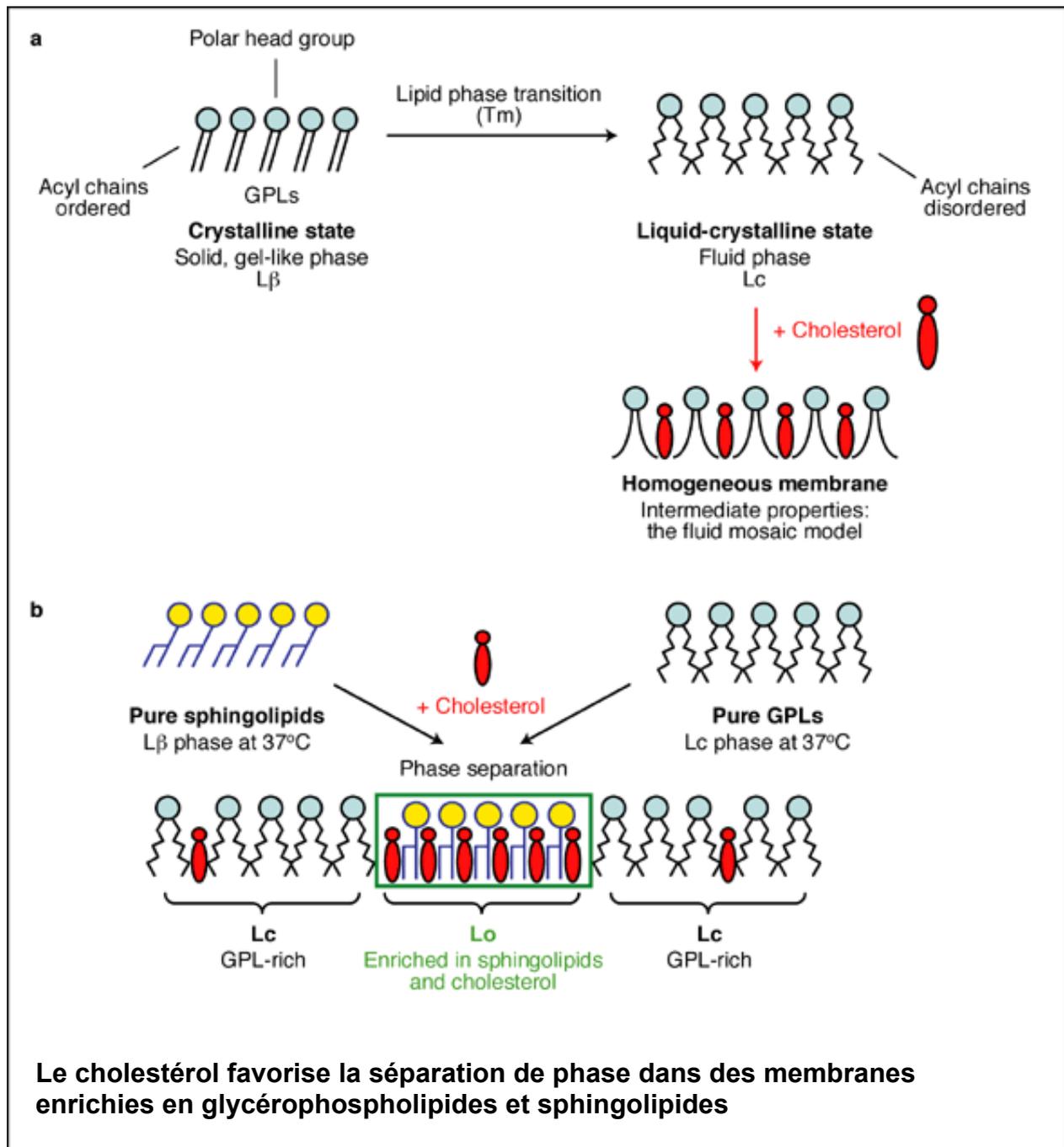


Figure I-24. Le Chol peut convertir des phases l_d ou L_{β} de bicouches lipidiques en phase l_o . (a) Dans une membrane enrichie en glycérophospholipides (GPLs) à l'état liquide cristallin L_c , l'association du Chol aux GPLs, longs et saturés de préférence, induit l'apparition d'une phase plus ordonnée (b) Dans une bicouche lipidique composée de sphingolipides en phase solide ou gel L_{β} et de GPLs en phase L_c , le Chol conduit à la formation d'une phase liquide ordonnée riche en sphingolipides et Chol, coexistante avec une phase liquide cristalline désordonnée pauvre en Chol. D'après Expert Reviews in Molecular Medicine, 2002.

Un outil très puissant permettant d'observer une séparation de phase est l'utilisation de sondes fluorescentes se distribuant préférentiellement dans l'une des phases liquides. Des

coexistences de phase l_o/l_d ont pu être mises en évidence par microscopie à fluorescence sur des monocouches à l'interface air-eau, sur des monocouches et bicouches supportées, et sur des vésicules géantes unilamellaires contenant de la SM, des PC insaturées, et du Chol (Dietrich et al., 2001a; Dietrich et al., 2001b; Samsonov et al., 2001). Dietrich et collaborateurs (Dietrich et al., 2001a) ont ainsi examiné des GUVs composées d'un mélange ternaire des trois composants majeurs des membranes cellulaires par microscopie confocale. Le mélange lipidique utilisé était composé de DOPC/Chol/SM à des rapports 1:1:1, additionné de 1 mol% de ganglioside (Figure I-25). Un analogue lipidique fluorescent y a été incorporé, le « Laurdan ». Ce marqueur présente les caractéristiques suivantes : il se répartit de façon homogène entre phase ordonnée et non-ordonnée, et son spectre d'émission de fluorescence est sensible au niveau d'ordre des chaînes d'acides gras qui l'entourent. Celui-ci varie donc en fonction de la phase adoptée par les lipides environnants, rendant ainsi possible la discrimination entre les phases ordonnée et liquide désordonnée. Le spectre d'émission est bleu en phase ordonnée, tandis qu'en phase liquide désordonnée il se déplace du bleu au vert.

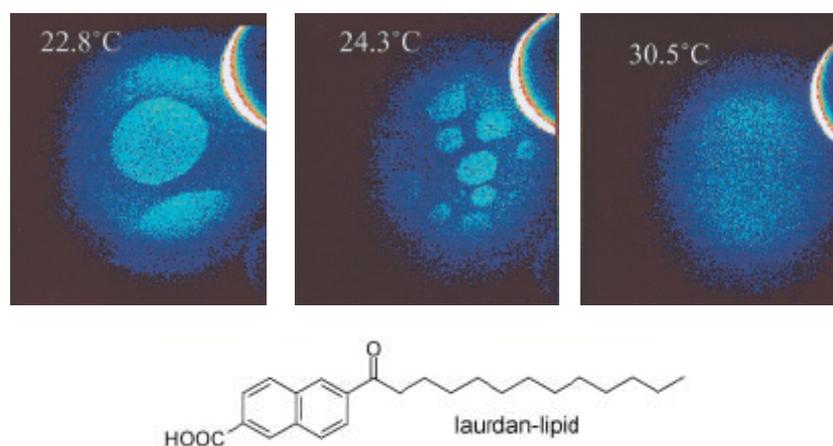


Figure I-25. Formation de domaines dans des GUVs composées de DOPC/Chol/SM (1/1/1) en fonction de la température. Visualisation des domaines grâce à la présence d'un marqueur lipidique (« Laurdan ») en microscopie à deux photons. D'après (Dietrich et al., 2001a).

Des domaines ayant des tailles de 10 μm environ ont été observés à la surface des vésicules, indiquant la séparation de phase et la formation de domaines en phase l_o . Ces domaines diminuent en taille lorsque la température augmente, et ils finissent par disparaître lorsque la température de transition de phase est dépassée, ce qui prouve leur existence en tant que structures induites par la séparation de phase. La capture de deux images en mode résolu

dans le temps a montré que les domaines se déplaçaient les uns par rapport aux autres, révélant ainsi que les domaines en phase l_o étaient mobiles dans la phase la plus liquide.

Les études portant sur les variations d'épaisseur de membranes présentant des séparations de phase offrent elles aussi la possibilité de visualiser la formation de tels domaines. Les études par AFM (Atomic Force Microscopy) sont habituellement réalisées afin de détecter ces différences d'épaisseur, qui sont de l'ordre de 0,5-1 nm (Milhiet et al., 2001). Il est nécessaire d'utiliser des bicouches ou monocouches supportées (c'est-à-dire recouvrant une surface solide). La pointe mobile utilisée pour l'AFM peut ensuite détecter les différences de hauteur causées par les changements de composition lipidique et de structure de la monocouche. Etant donné que les lipides impliqués dans une séparation de phase possèdent très souvent des longueurs de chaînes différentes, les différences de hauteur détectées fournissent une preuve indirecte de la séparation de phase et de la structure du domaine qui en résulte. Milhiet et collaborateurs ont ainsi analysé par AFM l'influence de l'augmentation croissante de Chol sur la formation de domaines dans des monocouches POPC/SM (Figure I-26). En l'absence de Chol, de larges domaines apparaissent (10^4 nm² environ), qui croissent en taille avec l'augmentation de la concentration en SM. L'état physique ici est une coexistence de domaines solides (enrichis en SM) et liquides (enrichis en POPC). L'ajout de Chol dans des quantités comprises entre 20 et 50 mol% dans une monocouche composée de SM et POPC (3:1) provoque de grands changements dans la distribution et la taille des domaines. En effet, alors que le Chol favorise la connexion entre les domaines de SM à une concentration de 20 mol%, l'augmentation croissante de la quantité de Chol de 20 à 55 mol% réduit progressivement la taille des domaines et les différences de hauteur entre les phases. Une hétérogénéité latérale reste cependant toujours observable à 33 mol% Chol.

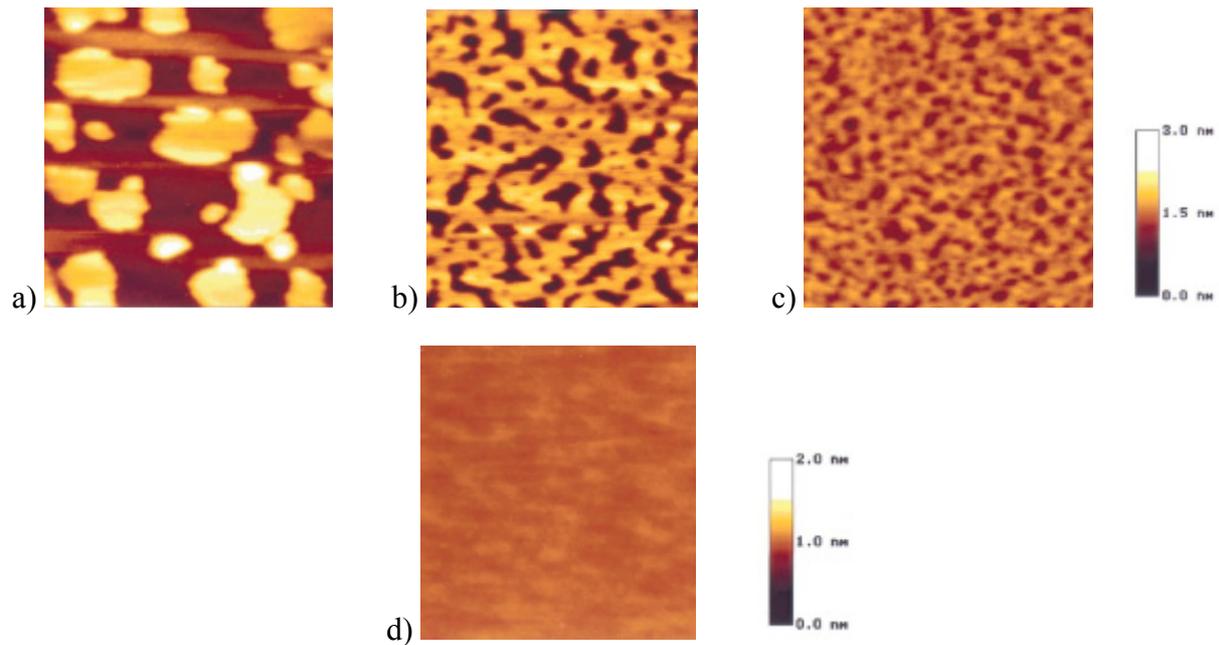


Figure I-26. Détection de domaines lipidiques par AFM sur des mélanges de POPC/SM. a) 0% Chol, b) 20% Chol, c) 33% Chol, d) monocouche POPC pure. A droite de chaque série d'images sont représentées les échelles. D'après (Milhiet et al., 2001).

2. Diagramme de phase de mélanges ternaires

Les différentes interactions du Chol avec les glycérophospholipides et les sphingolipides en particulier la SM, et ont été étudiées et sont reflétées dans un diagramme de phase ternaire de palmitoyl-SM, POPC, et Chol (de Almeida et al., 2003). Il s'agit là du premier diagramme de phase de bicouches lipidiques formées à partir du mélange ternaire des trois composants lipidiques majeurs du feuillet exoplasmique des membranes plasmiques de mammifères. Bien qu'il soit relativement simple en termes de composition en comparaison avec une membrane biologique, il constitue néanmoins un moyen intéressant pour comprendre le comportement physique du feuillet exoplasmique de la membrane plasmique. Le diagramme de phase (Figure I-27) montre que seules les phases l_0 et l_d coexistent aux concentrations lipidiques mimant la composition du feuillet externe (région D sur le diagramme). Chacune des phases coexistantes renferme les trois composants chimiques du système, la phase l_0 étant enrichie en SM, et la phase l_d étant enrichie en POPC.

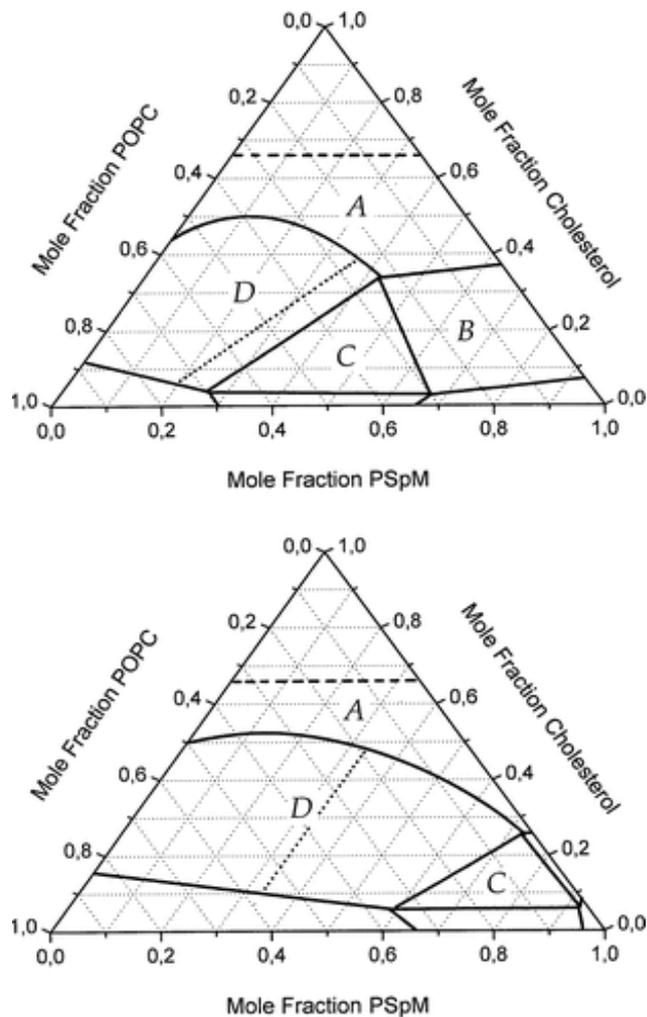


Figure I-27. Diagrammes de phase de bicouches lipidiques hydratées, préparées à partir de mélanges ternaires de palmitoyl-SM (PSpM), POPC, et Chol. Un diagramme de phase obtenu expérimentalement à 23°C est présenté en haut, et un diagramme de phase hypothétique à 37°C est présenté en bas. Dans chaque figure, la ligne en traits à 66 mol % Chol indique la limite hypothétique de solubilité du Chol dans la bicouche lipidique. Les régions principales du diagramme de phase ont été désignées de A à D. La région A indique une phase l_o seule. La région B correspond à une zone de coexistence de phases $s_o + l_o$. La région centrale triangulaire C est une zone où coexistent 3 phases: $l_d + l_o + s_o$. La région D désigne une zone de coexistence de 2 phases: $l_d + l_o$. Dans cette dernière région, une ligne en pointillés au niveau de la zone de composition 1:1:1 probable a été tracée. Finalement, des régions mineures au niveau de la base des diagrammes n'ont pas été légendées mais correspondent à une phase l_d simple, une région de co-existence de 2 phases : $s_o + l_d$ et une phase simple s_o . D'après (Simons and Vaz, 2004).

Sur la figure I-28, on observe sur des vésicules géantes unilamellaires des séparations de phase en fonction des proportions de lipide contenu dans un mélange ternaire. Le mélange consiste ici en un glycérophospholipide présentant une insaturation sur chacun des acides gras : la DOPC, la palmitoyl-SM (PSM) et le Chol. Le domaine clair constitue la phase liquide désordonnée riche en glycérophospholipide (le domaine apparaît fluorescent en raison de la partition préférentielle de la sonde fluorescente dans la phase l_d) et les domaines sombres représentent la phase liquide ordonnée l_o enrichie en SM et Chol.

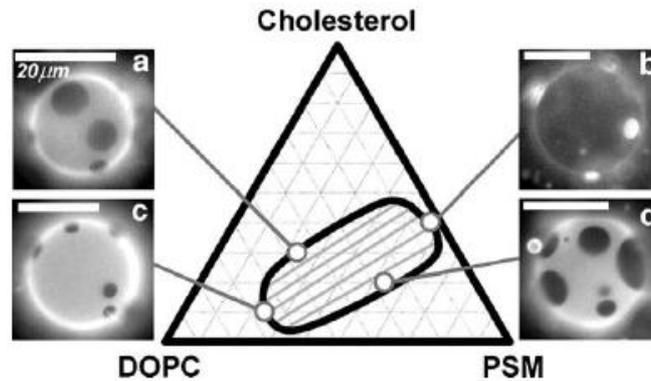


Figure I-28. Diagramme de phase montrant la coexistence de phase liquide-liquide d'un mélange ternaire: Chol, DOPC, Palmitoyl-SM (PSM) à 25°C. Les images en microscopie de fluorescence de vésicules géantes montrent les différents états membranaires pour des proportions DOPC/PSM/Chol variables. (a) 2:1 DOPC/PSM +30% Chol, (b) 1:19 DOPC/PSM +40% Chol, (c) 3:1 DOPC/PSM +10% Chol, (d) 1:2 DOPC/PSM +20% Chol. D'après (Veatch and Keller, 2005).

I.2.3 Apport des membranes modèles à la compréhension des radeaux membranaires biologiques

I.2.3.1 Radeaux membranaires cellulaires et phase l_o

Les études sur les membranes modèles ont démontré que les bicouches lipidiques pouvaient exister sous plusieurs états physiques ou phases en fonction de la composition en lipides et de la température. Les mélanges ternaires de lipides composés de PC/SM/Chol mimant la composition du feuillet externe de la membrane plasmique, présentent une immiscibilité liquide-liquide et ségrègent en domaines l_o et l_d à température physiologique comme tend à le montrer le diagramme de phase théorique à 37°C de la figure I-27. La SM, qui porte très majoritairement des chaînes hydrocarbonées saturées, est distribuée préférentiellement avec le Chol dans des domaines en phase l_o . Les phospholipides insaturés sont en revanche les constituants majeurs de la phase l_d . La présence de Chol est cruciale pour la formation et le maintien de cette coexistence de phase.

Considérant la composition riche en Chol et sphingolipides des DRMs, la résistance au Triton X-100 à froid des protéines GPI a été proposée comme étant liée à l'état physique en phase l_o des fractions membranaires résistantes (Ahmed et al., 1997; Schroeder et al., 1994).

Les radeaux membranaires ont donc été corrélés aux domaines en phase liquide ordonnée l_o existant dans les membranes modèles (London and Brown, 2000).

La composition lipidique des radeaux lipidiques insolubles aux détergents n'est pas la seule preuve fournie de l'existence d'une phase l_o dans les membranes biologiques. Des liposomes formés d'un mélange binaire de DPPC et de Chol (2:1), proportions qui se situent dans la région de phase liquide ordonnée dans le diagramme de phase (Ipsen et al., 1987), se sont montrés complètement insolubles dans les conditions utilisées pour définir les radeaux lipidiques par l'insolubilité aux détergents. De la même façon, des liposomes de compositions approchant celles des radeaux lipidiques, enrichis en Chol et sphingolipides, ont été également très largement résistants au traitement par détergent (Schroeder et al., 1994). Lors d'expériences comparant des mélanges lipidiques capables de former des domaines en phase l_o et des mélanges ne le permettant pas, d'excellentes corrélations ont pu être faites entre l'insolubilité aux détergents, et la formation de domaines liquides ordonnés. Ces études ont été effectuées par une méthode d'extinction (ou « quenching ») de fluorescence. La sonde, le diphénylhexatriène (DPH), se distribue préférentiellement dans les phases les plus ordonnées, alors que son « quencher » à courte distance partitionne dans les phases désordonnées. Ainsi l'augmentation de la fluorescence a été une indication d'une ségrégation, au moins partielle, de la sonde fluorescente dans les domaines l_o (pour revue, (London, 2002)).

Il faut cependant reconnaître que la composition lipidique d'une membrane cellulaire est beaucoup plus complexe qu'un mélange ternaire de lipides. L'état physique de ces mélanges complexes est inconnu. De façon intéressante, Dietrich et collaborateurs (Dietrich et al., 2001a) ont pu reconstituer des vésicules géantes à partir de lipides isolés de membrane de bordure en brosse provenant du tubule contourné proximal de rein, et ont mis en évidence dans ce système comportant toutes les espèces moléculaires lipidiques naturellement rencontrées la présence de deux phases. Dans ce système complexe, la coexistence de deux phases est également dépendante du Chol comme prédit dans le modèle radeaux lipidiques. Confirmant ces résultats sur cellules, Meder et collaborateurs ont pu révéler récemment grâce à la technique de FRAP une séparation de phases liquide-liquide *in-vivo* dans des membranes de cellules épithéliales polarisées (Meder et al., 2006).

Dans les membranes modèles, la taille des domaines l_o varie grandement en fonction de la température, la pression, et la composition. Les domaines peuvent être suffisamment grands pour être visibles en microscopie optique, ou bien plus petits que la limite de

résolution d'un microscope (Feigenson and Buboltz, 2001). La variabilité en taille des domaines a également été montrée par de Almeida et collaborateurs (de Almeida et al., 2005) en appliquant la méthode de FRET sur des mélanges PC/SM/Chol, suggérant que les interactions lipides-lipides seules sont capables de créer des domaines dans des échelles très différentes. Par ailleurs les membranes cellulaires possèdent une composition lipidique très complexe, et le fait que des lipides soient continuellement ajoutés ou enlevés de la membrane complique la modélisation. Mais au regard de la composition et de la solubilisation par les détergents, de nombreuses propriétés des radeaux seraient semblables à celles observées dans les membranes modèles de composition ternaire (PC insaturée, SM et Chol) (de Almeida et al., 2003).

I.2.3.2 Triton X-100 et solubilisation des mélanges lipidiques modèles

Un certain nombre de travaux ont contribué à une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire de solubilisation des membranes lipidiques par les détergents. L'étude de Sot et collaborateurs (Sot et al., 2002), par exemple, a mis en évidence une solubilisation par du Triton X-100 facilitée (c'est-à-dire exigeant moins de détergent) à 4°C par rapport à 37°C des membranes composées de PC/SM/Chol. Ils ont indiqué de plus que l'augmentation de la fluidité membranaire dans ce système n'était pas corrélée avec une solubilisation plus aisée, et surtout que des interactions entre SM et Chol étaient nécessaires à l'insolubilité des membranes. D'autres études ont montré de la même façon que les monocouches et bicouches de SM/Chol étaient plus résistantes à la solubilisation par le Triton X-100 que les monocouches SM pures, appuyant ici encore le rôle des interactions entre SM et Chol dans la résistance à la solubilisation. Les liaisons hydrogène entre les molécules de Chol et de SM doivent expliquer ce comportement. Par ailleurs, comme cela est suggéré dans cette dernière étude, différentes observations s'opposent à l'insolubilité présumée des sphingolipides à T_M élevée. Ainsi le Triton X-100, à de faibles concentrations, pénètre dans les membranes contenant de la SM plus aisément que dans les membranes phospholipidiques de DPPC dans lesquelles les chaînes acyles sont mieux assorties. En outre, les membranes de SM sont solubilisées pour de plus faibles concentrations de détergent que ne le sont les membranes de glycérophospholipides (Nyholm and Slotte, 2001). Enfin, toujours dans le même sens, Hertz et collaborateurs ont montré que dans des mélanges PC/SM, plus la proportion en SM était

importante, moins la quantité de détergent nécessaire pour solubiliser était élevée (Hertz and Barenholz, 1977).

Cependant, comme cela l'a déjà été mentionné dans la première partie, la solubilisation d'une membrane par un détergent pourrait avoir des effets imprévus et induire la formation de structures non physiologiques à partir de la membrane d'origine. Des travaux sur les membranes modèles tendent à le confirmer. Ainsi, selon les deux études décrites précédemment (Hertz and Barenholz, 1977; Sot et al., 2002), les DRMs seraient en fait le résultat d'une solubilisation partielle et d'un réassemblage de lipides obtenu après fusion des membranes. Des études complémentaires en microscopie électronique de vésicules traitées par de petites quantités de détergent ont mis en évidence la conversion des vésicules multilamellaires initiales en de plus larges structures contenant des bicouches ramifiées, confirmant la fusion possible de bicouches après action de détergent (Hertz and Barenholz, 1977). Par ailleurs, il a récemment été avancé que le Triton favoriserait en fait la formation de domaines l_o dans des bicouches modèles (Heerklotz, 2002). En effet, le Triton par des interactions non idéales avec la SM, déplacerait encore davantage ce lipide vers les domaines en phase ordonnée (d'où le Triton semble exclu). La présence du détergent induirait donc davantage la ségrégation des constituants de base des microdomaines au sein de la bicouche, et le nombre et/ou la taille des domaines en phase ordonnée présents à l'origine seraient de ce fait surestimés.

Les effets potentiels de promotion ou de réduction des domaines induits par le détergent Triton X-100 ont notamment été énoncés par London et Brown (London and Brown, 2000) mais sont encore souvent ignorés. La possibilité de réarrangements non physiologiques pendant le traitement par un détergent doit donc inciter à la prudence quant à la méthodologie adoptée et l'interprétation des résultats.

II. Formation de domaines “raft-like” dans des LUVs marquées par l’analogue phospholipidique fluorescent C12NBD-PC

II.1 Introduction

L’intérêt actuel porté sur les microdomaines membranaires ou radeaux lipidiques est la conséquence de leur rôle fonctionnel putatif dans des processus tels que la transduction du signal (Simons and Toomre, 2000), l’adressage de protéines et lipides (Simons and van Meer, 1988), le transport de Chol (Simons and Ikonen, 2000) et l’endocytose (Sharma et al., 2002). Une approche biochimique des radeaux lipidiques a émergé lorsque des membranes résistantes aux détergents (DRMs) ont été isolées à partir de lysats cellulaires, après traitement par des détergents à certaines températures et rapports détergent/masse cellulaire (Schuck et al., 2003).

La tentative de corréler les informations acquises d’études sur les DRMs aux propriétés des radeaux dans les membranes cellulaires vivantes a conduit à des investigations sur des membranes modèles, présentant une coexistence de phase l_0/l_d dans des conditions physiologiques (Dietrich et al., 2001a). Des diagrammes de phase de mélanges lipidiques « pro-raft » ont été construits pour établir la composition et les limites de phase des domaines l_0 dans des monocouches ainsi que dans des systèmes de vésicules membranaires tels que les MLVs, LUVs, GUVs (de Almeida et al., 2003; Veatch and Keller, 2002). Ces systèmes ont été utilisés dans le but de caractériser la taille des domaines l_0 dans le cas particulier des mélanges lipidiques ternaires composés de PC/SM/Chol, par des méthodes de transfert d’énergie de fluorescence résolue dans le temps (de Almeida et al., 2005).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la mise au point d’une méthodologie permettant une estimation quantitative de la fraction membranaire en phase l_0 dans les membranes hétérogènes de type LUVs. La membrane modèle LUV examinée est constituée de PC/SM/Chol 2:1:X (avec une valeur de X allant jusqu’à 45 mol%) et obtenue après extrusion à travers des filtres de polycarbonate de 100 nm. Les propriétés de « self quenching » - que nous désignerons ici par les termes auto-extinction - dépendantes de la

concentration du C12NBD-PC, phospholipide marqué, ont été mises à profit pour révéler la coexistence de phase l_o/l_d et estimer les fractions de surface membranaire en phase liquide désordonnée et liquide ordonnée, Φ_d et Φ_o respectivement (avec la condition $\Phi_d + \Phi_o = 1$).

Les analogues lipidiques de NBD (nitrobenzoxadiazole), NBD-PE (marqué au niveau de la tête polaire) et NBD-PC (liaison possible au NBD au niveau de différentes positions sur les chaînes) ont été utilisés dans de nombreuses études impliquant les membranes biologiques et modèles (Chattopadhyay, 1990). L'intensité de fluorescence du NBD est modulée par deux phénomènes :

- l'effet de l'environnement sur la fluorescence du NBD, autrement dit la composition et la structure de la membrane (tout particulièrement l'état de la phase) (Brennan et al., 1990; Chattopadhyay and London, 1988; Mazeret et al., 1996),
- l'auto-extinction de fluorescence du NBD de façon dépendante de sa concentration dans les membranes lipidiques (Brown et al., 1994).

Mazeret et collaborateurs (Mazeret et al., 1996) ont montré que la réponse de fluorescence du groupe NBD était fortement dépendante de la structure chimique et de l'état physique des phospholipides en présence, ainsi que de la structure chimique de la sonde lipidique elle-même. Parmi les différents paramètres de fluorescence étudiés (les déplacements de Stokes, les rendements quantiques...), ce sont les rendements quantiques qui se sont montrés de loin les plus sensibles à ces facteurs structuraux et environnementaux, tandis que les déplacements de Stokes n'étaient pratiquement pas affectés. Ainsi toujours dans cette étude, les auteurs ont observé que selon la sonde phospholipidique et les phospholipides en présence, l'émission de fluorescence du groupe NBD variait jusqu'à un facteur 5. De plus, comme cela l'avait été initialement proposé par Hoekstra (Hoekstra, 1982), l'auto-extinction a été reconnue comme un mécanisme dominant dans le changement du rendement quantique de fluorescence du NBD dans les membranes lipidiques.

Une autre caractéristique importante des analogues lipidiques NBD est leur distribution inégale entre les différentes phases lipidiques coexistant dans une membrane lipidique. La plupart des études utilisant des analogues lipidiques marqués avec du NBD ont été réalisées avec le NBD-PE, marqué au niveau de la tête polaire, ou avec des analogues marqués au niveau des chaînes d'acide gras (Mesquita et al., 2000). Les analogues NBD-PCs marqués au niveau des chaînes semblent perturber la structure de la bicouche plus fortement comparativement aux NBD-PEs marqués au niveau de la tête. Dans les cas où le groupe NBD

est lié aux chaînes, l'emplacement du NBD dans la membrane doit imposer des contraintes stériques et polaires dans la région hydrophobe de la bicouche lipidique selon la position du NBD et la longueur des chaînes hydrocarbonées de PC. Il a été également suggéré que le NBD lié à l'extrémité d'une chaîne acyle a tendance à s'approcher de l'interface lipide-eau, induisant une torsion de la chaîne hydrocarbonée (Chattopadhyay, 1990; Chattopadhyay and London, 1988; Huster et al., 2001). Ce qui en résulte est une exclusion presque totale de l'analogue lipidique (cas du C12NBD-PC) des phases liquides ordonnées, et une accumulation préférentielle du lipide marqué dans les phases désordonnées (Mesquita et al., 2000). Ceci a été exploité pour la visualisation directe de la ségrégation lipidique en domaines riches en Chol, dans des monocouches contenant des phases liquides ordonnées excluant la sonde fluorescente (Worthman et al., 1997).

La coexistence de domaines en phase l_o/l_d dans des bicouches de GUVs et des monocouches, de composition lipidique variable, a été observée directement par microscopie de fluorescence en utilisant différents analogues lipidiques fluorescents (Dietrich et al., 2001a; Veatch and Keller, 2002). De façon générale, les molécules fluorescentes amphiphiles montrent une préférence pour l'une des deux phases, probablement à cause de la perturbation structurale qu'elles induisent, comme c'est le cas lors de la perturbation stérique résultant de la présence d'un fluorophore encombrant, du mésappariement hydrophobe de chaînes hydrocarbonées différentes, etc. Il apparaît que la phase l_d accommode plus efficacement les analogues lipidiques fluorescents. Veatch et Keller (Veatch and Keller, 2002) ont par exemple observé la coexistence de domaines en phase l_o et l_d dans des GUVs composées de PC/SM/Chol dans des proportions différentes, en utilisant la Texas Red di(16:0)PE comme marqueur se distribuant dans la phase pauvre en Chol. Par ailleurs, des études de notre équipe sur des mélanges de composition semblable ont utilisé le C12NBD-PC, qui révèle les domaines en phase l_o comme des tâches sombres baignant dans une membrane de GUV brillante en microscopie de fluorescence (Staneva et al., 2004; Staneva et al., 2005). Ainsi les observations en microscopie de fluorescence (possibles sur les GUVs mais pas sur les LUVs) ont mis en évidence une distribution largement préférentielle de la sonde dans les domaines en phase l_d de la membrane.

Les résultats obtenus avec les GUVs mettent en exergue la capacité de la sonde C12NBD-PC seule à mettre en évidence la coexistence de phase l_o/l_d dans une membrane hétérogène. Il nous est permis de penser qu'il en va de même pour l'examen avec le C12NBD-PC de l'hétérogénéité des membranes de type LUVs. Jusqu'ici les études en

fluorescence de la microhétérogénéité membranaire l_o/l_d des MLVs ou LUVs ont toujours impliqué deux sondes lipidiques différentes. Ces méthodes étaient basées sur l'extinction de fluorescence au niveau de MLVs, du DPH par la 12SLPC par exemple (Ahmed et al., 1997; Xu et al., 2001), ou le transfert d'énergie de fluorescence (FRET), entre la NBD-PE et la Rhod-PE par exemple, dans les LUVs (de Almeida et al., 2005; Loura et al., 2001). Cependant, cette approche apparaît complexe en raison de la distribution différente des sondes lipidiques entre les phases lipidiques, d'où l'intérêt de l'utilisation d'une seule molécule fluorescente rapportant la coexistence de phase.

Dans ce travail, nous avons examiné la coexistence de phase l_o/l_d dans les membranes de type LUVs en utilisant la propriété d'auto-extinction de fluorescence dépendante de la concentration du C12NBD-PC seul. Nous avons observé une diminution de l'intensité de fluorescence dépendante de la température, que nous avons interprété comme la conséquence de la formation et de la croissance en taille des domaines en phase l_o présents au niveau de la membrane des LUVs. Cette explication se justifie par l'effet de la présence de domaines en phase l_o dans la membrane lipidique, qui se concrétise par la diminution effective de l'espace membranaire disponible pour les espèces de C12NBD-PC lesquelles s'accumulent préférentiellement dans la phase l_d . La concentration locale en fluorophore dans la phase l_d augmente et le rendement quantique diminue. Nous avons utilisé cet effet pour estimer la fraction de la membrane de LUV occupée par les phases l_o et l_d en fonction de la température et du ratio molaire de Chol X compris entre 0 et 45 mol%, pour des compositions de LUV étant PC/SM/Chol 2:1: X .

II.2 Méthodologie

II.2.1 Matériels utilisés

Pour la préparation des mélanges lipidiques, nous avons utilisé des lipides naturels dont les chaînes carbonées sont différentes, et non pas de synthèse (excepté pour le C12NBD-PC) afin de reproduire « au mieux » la complexité de composition des membranes biologiques. Des mélanges lipidiques de composition ternaire (PC/SM/Chol) ont été réalisés dans le but de faire apparaître une coexistence de phase au sein des membranes de LUVs. Les

études en fluorescence ont été effectuées sur des membranes lipidiques modèles composées des espèces lipidiques suivantes:

1. Egg yolk phosphatidylcholine (PC) (phosphatidylcholine de jaune d'œuf) ; Sigma. Composition : C16:0 : 34%, C18:0 : 11%, C16:1 : 2%, C18:1 : 32%, C18:2 : 18%, C20:4 : 3%. Poids moléculaire : 760.09 g/mol.
2. Egg yolk sphingomyelin (SM) (sphingomyéline de jaune d'œuf) ; Sigma. Composition : C16:0 : 84%, C18:0 : 6%, C20:0 : 2%, C22:0 : 4%, C24:0 : 4%. Poids moléculaire : 703.04 g/mol.
3. Chol (Chol) ; Sigma. Poids moléculaire : 386.66 g/mol.
4. 1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine (C12NBD-PC) ; Avanti Polar Lipids. Poids moléculaire : 856.05 g/mol. Longueur d'onde d'excitation : 470 nm, longueur d'onde d'émission : 538 nm.

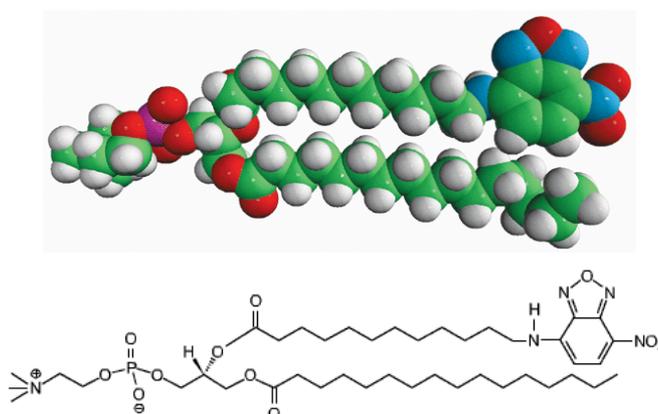


Figure II-1. Structure et formule chimique du C12NBD-PC. D'après www.avantilipids.com.

II.2.2 Préparation des vésicules

II.2.2.1 Vésicules de type LUV

Les vésicules unilamellaires de type LUVs ont été préparées par la méthode d'extrusion (MacDonald et al., 1991). La préparation des échantillons de lipides a été effectuée après avoir dissous puis mélangés les lipides indiqués dans un mélange chloroforme

méthanol (9:1) dans des quantités adéquates pour obtenir les proportions indiquées. Le solvant a ensuite été évaporé sous un flux d'azote sec, sans oxygène. Les mélanges lipidiques secs ont été ensuite maintenus sous pression réduite pendant 1 h afin d'éliminer toute trace de solvant pouvant être nuisible à la préparation des LUVs, puis hydratés dans un tampon HEPES 5 mM pH 7.5, afin d'obtenir une concentration lipidique de 1 mM. Le tampon HEPES a été choisi car il présente des caractéristiques favorables à notre étude notamment la résistance aux dilutions et aux changements de température, l'insolubilité dans les membranes, un pouvoir tampon efficace à pH physiologique (celui de notre étude), et une faible absorption dans le visible.

Les échantillons ont été ensuite mélangés vigoureusement (« vortexés ») pendant 30 s à température ambiante (23°C), puis chauffés à 65°C pendant 30 min, mélangés vigoureusement à nouveau pendant 30 s afin que tous les lipides s'assemblent en phase lamellaire (MLVs ou LUVs), et incubés encore à 65°C pendant 15 min. L'utilisation d'une température au-delà de la température de transition de phase principale des lipides a eu pour but l'obtention d'un mélange de composition lipidique homogène pour la préparation des LUVs. Les vésicules multilamellaires ont été ensuite extrudées à l'aide d'un extrudeur à petit volume « LiposoFast » équipé de membranes de polycarbonate (Avestin) selon la procédure suivante : 12 extrusions à travers une membrane à pores de 800 nm, puis 21 extrusions à travers une membrane à pores de 100 nm. La première série de passages à travers des pores de 800 nm a eu pour objectif de rompre les MLVs. La seconde série de passages à travers des pores de 100 nm et un grand nombre de passage (21) sont nécessaires afin de permettre l'obtention de LUVs les plus monodisperses possible. La figure II-2 illustre le montage d'un extrudeur.

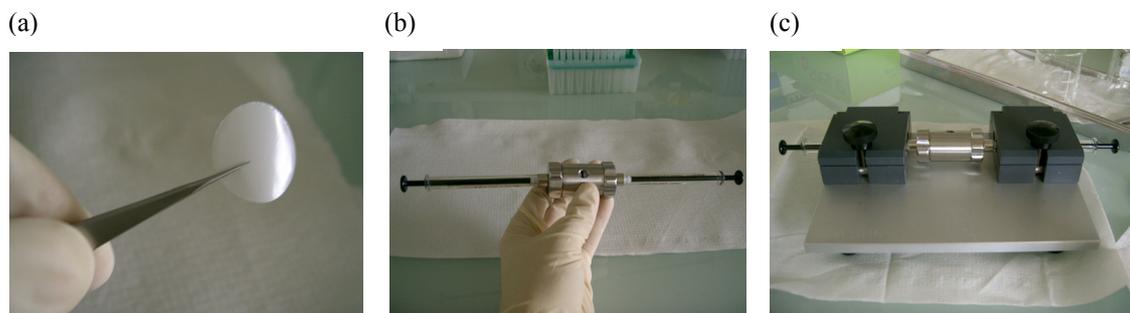


Figure II-2. Montage d'un extrudeur. (a) Membrane de polycarbonate ; (b) Un extrudeur est composé de deux seringues en verre et d'un cylindre à l'intérieur duquel la membrane de polycarbonate est maintenue, les passages à travers la membrane se font manuellement en poussant alternativement chacune des seringues ; (c) Stabilisateur d'extrudeur.

Enfin, les échantillons de LUVs ont été gardés à 4°C, à l'abri de la lumière qui peut altérer la sonde lipidique fluorescente, jusqu'à leur utilisation en spectrométrie à fluorescence. Dans les systèmes binaires et ternaires composés de PC/SM ou PC/SM/Chol, le rapport PC/SM est toujours 2:1 mol/mol. La concentration en C12NBD-PC est 4 mol%, sauf indications contraires.

II.2.2.2 Vésicules de type GUV

Les vésicules géantes unilamellaires GUVs ont été obtenues selon la méthode d'électroformation (Angelova and Dimitrov, 1986; Staneva et al., 2004) dans une chambre d'électroformation où la température est contrôlée. Les GUVs ont été formées à 34°C à partir d'un mélange PC/SM/Chol/C12NBD-PC avec une quantité de C12NBD-PC de 4 mol%, une quantité X de Chol de 0, 10, 20, ou 35 mol%, et des quantités de PC/SM de telle sorte que le rapport 2:1 mol/mol soit toujours respecté.

Le protocole spécifique d'électroformation a été le suivant : le mélange lipidique est préparé dans du diéthyléther/méthanol/chloroforme 72:10:18 v/v, à une concentration de 0.5 mg/ml. Une goutte de la solution lipidique (1 μ l) est déposée sur chacune des deux électrodes de platine de la chambre de travail (diamètre 0.8 mm, distance entre les axes de 3 mm) (Figure II-3) et séchée sous vide à température ambiante pendant 30 minutes pour enlever toute trace de solvant, et pour que les lipides s'assemblent en une phase lamellaire parfaitement déshydratée. La chambre de travail est ensuite posée sur la platine du microscope. Une tension alternative de 100 mVpp (pic à pic), 10 Hz, est appliquée aux électrodes à température ambiante (environ 21°C). Un thermocouple placé à une distance d'environ 0.5 mm d'une des électrodes est utilisé pour mesurer la température. Un volume de 1.2 ml de tampon HEPES 0.5 mM, pH 7.4 est ajouté à la chambre de préparation en évitant toute agitation pour éviter que le film lipidique ne se décolle. La tension appliquée et la température sont modifiées progressivement jusqu'à une tension finale de 500 mVpp, 10 Hz et la température indiquée. La durée nécessaire à l'électroformation est d'environ 2 à 3h. Au terme de cette durée, le courant est coupé, et nous pouvons observer plusieurs GUVs de taille variable (20 à 100 μ m). (Pour l'installation des éléments nécessaires à l'électroformation, voir la figure II-4).

Les domaines l_0 « raft-like » ont été visualisés par microscopie à fluorescence.



Figure II-3. Image d'une chambre d'électroformation. On distingue les deux électrodes de platine sur lesquelles est déposée la solution lipidique.

II.2.3 Microscopie à fluorescence

Le microscope utilisé était un Zeiss Axiovert 200M, équipé d'une lampe à fluorescence (N HBO 103, Zeiss), d'une unité Lambda 10-2 (Sutter Instrument) (Figure II-4). La détection des images de fluorescence a été effectuée à l'aide d'une caméra CCD B/W refroidie (Cool SNAP HQ). La prise d'images était pilotée par le logiciel Metamorph 6.0 (Roper Sci.). Le suivi de la morphologie des GUVs et de la coexistence de phase sur la membrane hétérogène des GUVs a été réalisé en contraste de phase et en fluorescence (Figure II-5) (filtre Zeiss 16, Ex/Em = 485/>520nm).

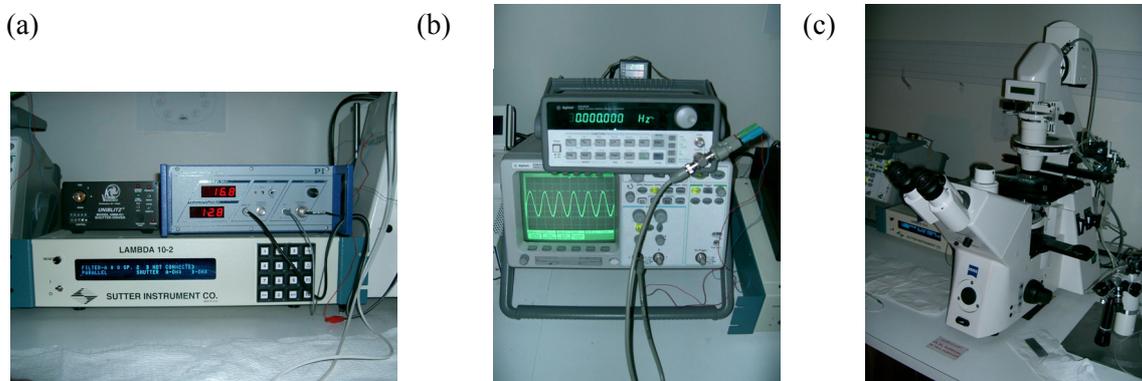


Figure II-4. Images de l'installation des éléments nécessaires à l'électroformation et à la visualisation des GUVs. (a) Lampe à fluorescence HBO, et unité Lambda 10-2 contrôlant le jeu de filtres sélectionnant les longueurs d'onde d'excitation; (b) générateur de courant alternatif branché sur les électrodes de la chambre de travail et oscilloscope ; (c) microscope sur lequel est posée la chambre de travail, et grâce auquel s'effectue la visualisation des GUVs en fluorescence.

L'analogue lipidique C12NBD-PC marqué au niveau de l'une des deux chaînes hydrocarbonée est exclu de la phase ordonnée l_o , et se distribue préférentiellement dans la phase liquide désordonnée l_d . Les domaines l_o apparaissent donc comme des tâches rondes sombres dans une membrane environnante brillante. Comme ces molécules sont de véritables

phospholipides, elles peuvent être incorporées dans de petites quantités sans déstabilisation de la structure en bicouche.

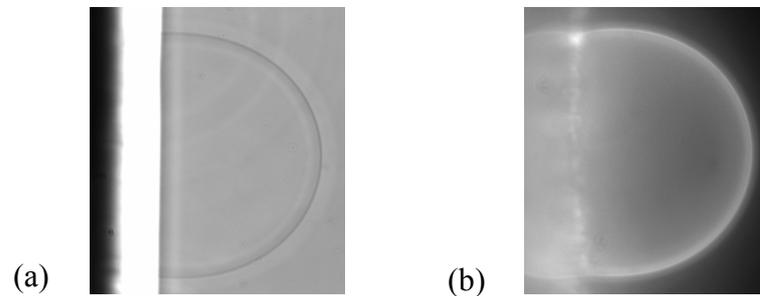


Figure II-5. Exemples d'images de LUV homogène en contraste de phase (a) et en fluorescence (b) Du fait de l'absence de coexistence de phase, la sonde fluorescente se répartit de façon uniforme au sein de la membrane.

II.2.4 Mesures en spectrophotométrie à fluorescence

II.2.4.1 Mesures

Les mesures de fluorescence à l'état stable de LUVs de composition binaire PC/SM et de composition hétérogène PC/SM/Chol ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre Cary Eclipse (Varian Instruments). La source de lumière est une lampe à Xénon : elle délivre une large bande de lumière, de l'UV jusqu'au rouge. L'absorption de photon par les molécules s'accompagne d'une désexcitation qui peut être radiative. C'est ce rayonnement de fluorescence envoyé dans toutes les directions qu'on analyse en fluorimétrie. Cette technique peut être appliquée à des molécules naturellement fluorescentes ou rendues fluorescentes par adjonction d'un réactif, comme le groupement NBD. On mesure généralement la puissance rayonnée par fluorescence à 90° du faisceau incident (Figure II-6).

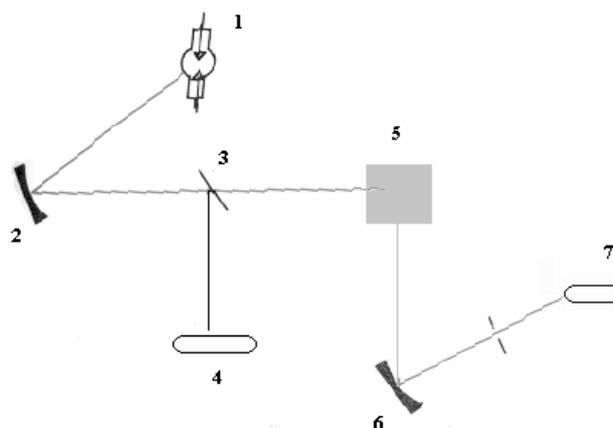


Figure II-6. Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre. 1 : lampe au xénon ; 2 : monochromateur d'excitation ; 3 : lame semi-transparente ; 4 : photomultiplicateur (mesure de la lumière incidente); 5 : échantillon (ou référence) ; 6 : monochromateur pour l'analyse du spectre de fluorescence ; 7 : photomultiplicateur (mesure de la fluorescence).

Des cuves de quartz (1 cm x 1 cm) ont été utilisées pour contenir les échantillons pendant les mesures. La température a été contrôlée grâce à un support de cuve thermostatée (Varian Instruments). Différents réglages ont été effectués. Ainsi les fentes d'excitation et d'émission ont été ajustées à 5 nm chacune pour notre étude. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 470 nm, et l'intensité maximale de fluorescence réémise mesurée à 538 nm (cf le spectre du NBD sur la figure II-7). Toutes les mesures de fluorescence ont été faites sur des échantillons lipidiques de concentration totale 0.5 mM. Nous avons choisi une quantité de C12NBD-PC de telle sorte que sa concentration finale dans la membrane des LUVs soit proche du seuil d'auto-extinction détecté dans le système LUVs PC, c'est-à-dire 4 mol% (voir la figure II-8, le seuil d'auto-extinction a été défini dans la zone où la relation intensité de fluorescence en fonction du pourcentage en NBD n'est plus linéaire). De cette façon, la diminution de sa fluorescence signe directement la concentration en fluorochrome dans une phase donnée. Les mesures de fluorescence réalisées à des températures croissantes et décroissantes (scans de température) ont été faites de 4 à 70°C aux températures de 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70°C puis de 70°C à 4°C aux mêmes températures, en laissant l'échantillon s'équilibrer pendant 5 minutes à chaque température.

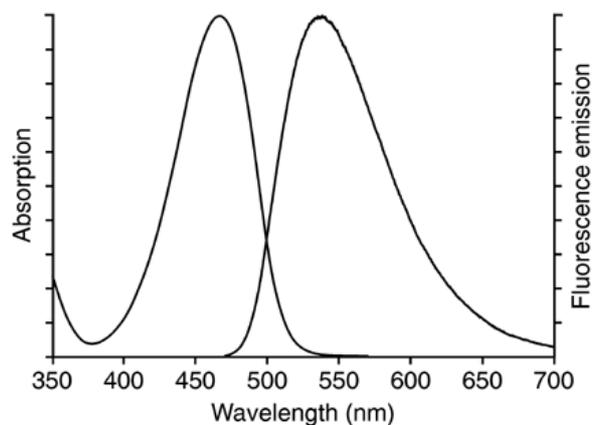


Figure II-7. Spectre d'absorbance et d'émission de fluorescence du NBD-PC.

Pour la mise en évidence de la coexistence de phase l_o/l_d au niveau des membranes de LUVs, nous avons utilisé la propriété d'auto-extinction de fluorescence du C12NBD-PC. Celle-ci est dépendante de la concentration en C12NBD-PC et rendue possible car les spectres d'excitation et d'émission se chevauchent (Figure II-7).

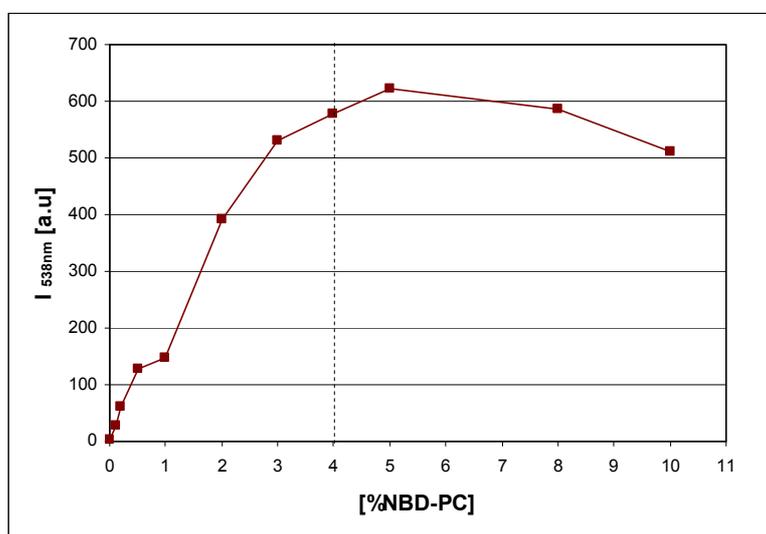


Figure II-8. Intensité de fluorescence du C12NBD-PC mesurée à 538 nm pour des LUVs PC contenant différentes concentrations en C12NBD-PC. On observe une relation non linéaire entre l'intensité de fluorescence et le pourcentage en C12NBD-PC. Une diminution de la fluorescence dépendante de la concentration en C12NBD-PC apparaît pour des concentrations supérieures à 5 mol%.

II.2.4.2 Principe de mise en évidence de la coexistence de phase sur les LUVs

La sonde C12NBD-PC se distribue de préférence dans la phase liquide désordonnée pauvre en Chol comme cela l'a été expliqué dans l'introduction de cette partie. Dans une membrane homogène de composition PC/SM (2:1), la sonde se répartit uniformément et donc la concentration locale (C_L) en C12NBD-PC dans une région de la membrane est la même que sa concentration moyenne (C_M) sur l'ensemble de la vésicule. Lorsque des domaines en phase ordonnée enrichis en Chol apparaissent, la sonde en est exclue, et se concentre dans la fraction membranaire en phase l_d . La concentration locale en C12NBD-PC dans la fraction membranaire en phase l_o est donc de 0 – si on considère une sonde s'excluant parfaitement de la phase l_o – et la concentration locale dans la fraction en phase l_d devient plus grande que la concentration moyenne (pour une illustration du phénomène, se référer à la figure II-9). Le rendement quantique diminue et l'auto-extinction de fluorescence qui en résulte est utilisée pour faire une estimation quantitative de la fraction membranaire occupée par la phase l_o .

Les paramètres quantitatifs de fluorescence se sont révélés être dépendants de petites variations dans la procédure expérimentale. Les facteurs responsables de variations étaient liés à la méthode de préparation des LUVs, au photoblanchiment, et à l'évaporation de solvant pendant l'ajout de la sonde fluorescente. La conservation des LUVs plusieurs jours à 4°C, a eu également pour conséquence l'agrégation des vésicules. La reproductibilité des mesures d'intensité de fluorescence spécifique sur des échantillons soigneusement préparés était de $\pm 8\%$. Cette erreur s'est élevée à $\pm 15\%$ pour des mesures sur des LUVs contenant 25 mol% de Chol. Ceci est probablement dû au fait que la phase l_o domine dans la bicouche des LUVs à cette concentration en Chol, et de petites variations dans le contenu en Chol de différentes vésicules peut produire des différences significatives dans l'intensité de fluorescence totale.

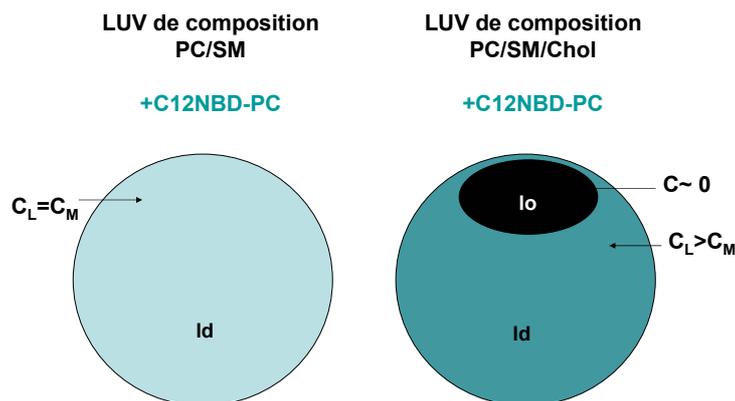


Figure II-9. Schéma illustrant l'exclusion de la sonde C12NBD-PC de la phase l_o , et sa concentration dans la phase l_d consécutivement à l'apparition de domaines en phase l_o . (C_L : concentration locale ; C_M : concentration moyenne).

II.3 Fluorescence du C12NBD-PC dans des membranes lipidiques homogènes sans coexistence de phase

Il est attendu que dans une bicouche lipidique homogène LUV, la concentration molaire membranaire moyenne en C12NBD-PC, C_M , doit être égale à la concentration molaire membranaire locale, C_L , de la sonde dans n'importe quelle région de la membrane.

II.3.1 Effet de l'environnement sur la fluorescence dans des membranes homogènes

L'effet de l'environnement lipidique sur l'intensité de fluorescence du C12NBD-PC inclu dans des bicouches lipidiques homogènes de composition variable a été examiné en tout premier lieu. La figure II-10 montre la dépendance à la température pour des valeurs comprises entre 4 et 70°C de la fluorescence spécifique (indiquée en intensité par μM de C12NBD-PC) de LUVs marquées avec 4 mol% C12NBD-PC, pour différentes compositions lipidiques et états de phase. Aux températures indiquées, les LUVs PC présentent une phase liquide désordonnée (l_d). Les LUVs PC/SM 2:1 mol/mol présentent également une phase l_d . Cependant on ne peut pas exclure la possibilité de l'apparition d'une phase L_β aux basses températures (de Almeida et al., 2003). La courbe de fluorescence des LUVs SM pures

montre un « décrochage » entre 35 et 40°C qui signe la transition entre la phase gel et la phase liquide désordonnée puisqu'il est connu que la transition de phase L_{β} à l_d de la SM d'œuf est détectée nettement autour de 38°C (Calhoun and Shipley, 1979). Enfin les LUVs SM/Chol 1:1 mol/mol montrent seulement une phase liquide ordonnée sur toute la gamme de température étudiée (de Almeida et al., 2003). Seules les courbes résultant des mesures ascendantes de température sont présentées, les courbes de température descendante pouvant se superposer sur celles-ci (voir la figure II-15).

L'intensité de fluorescence du NBD dans les LUVs de PC est très semblable à celle des LUVs de PC/SM 2:1 pour toutes les températures étudiées. La différence de composition lipidique des LUVs ainsi que la présence éventuelle d'une coexistence de phases L_{β} - l_d dans les LUVs PC/SM aux basses températures, n'ont donc pas d'effet significatif sur l'intensité de fluorescence dans ces deux membranes. Les fluorescences observées pour les LUVs SM pures et SM/Chol 1:1 mol/mol sont très basses, ce sont respectivement des membranes en phase gel (jusqu'à 40°C environ) et en phase l_o (pour toutes les températures). Lorsque les LUVs SM adoptent une phase l_d aux températures supérieures à 38°C, le comportement de la fluorescence rejoint celui des LUVs PC et PC/SM en phase l_d . On observe donc que l'intensité de fluorescence spécifique du NBD est plus élevée dans les phases l_d que dans les phases gel ou l_o . Une explication possible de ce phénomène serait que la partie NBD, située à l'extrémité de la chaîne hydrocarbonée coudée de PC, est expulsée plus efficacement de la région hydrophobe de la bicouche quand celle-ci est hautement structurée (comme c'est le cas dans les phases gel et l_o), exposant ainsi le NBD plus près de l'interface avec l'eau. Rappelons que le rendement quantique de fluorescence du fluorophore NBD est proche de zéro dans l'eau et augmente lorsque la polarité de l'environnement diminue (Lin and Struve, 1991).

Un autre phénomène qui apparaît est le suivant, lorsque la température augmente, la bicouche devient plus désordonnée, ce qui a pour conséquence une diminution monotone de l'intensité de fluorescence (Mesquita et al., 2000), liée probablement à une pénétration plus grande des molécules d'eau à l'intérieur de la bicouche lipidique désordonnée. Ceci a pour effet d'augmenter la polarité de l'environnement du NBD et par conséquent de diminuer l'intensité de fluorescence du NBD. Enfin nous pouvons remarquer que l'augmentation de température au niveau des bicouches dans un état physique ordonné (état gel pour LUVs SM en dessous de la T_M , ou état l_o pour LUVs SM/Chol 1:1 mol/mol pour les températures comprises entre 4° et 70°C) n'a pas d'influence sur la fluorescence suggérant que les phases ordonnées sont des structures relativement stables.

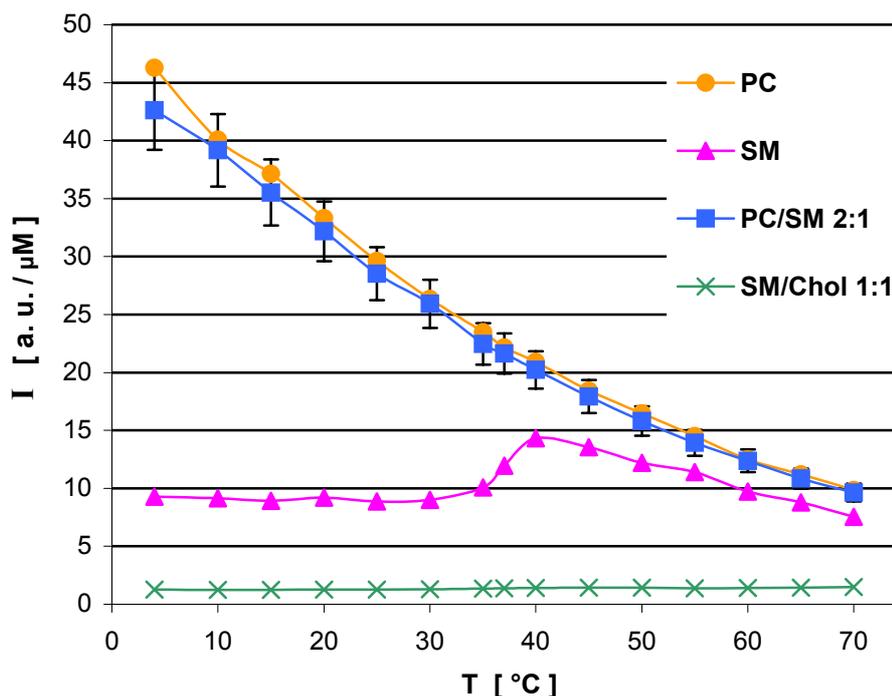


Figure II-10. Intensité de fluorescence spécifique du C12NBD-PC en fonction de la température (intensité I en a.u par μM de C12NBD-PC) dans des LUVs contenant 4 mol% C12NBD-PC, pour différentes compositions et états de phase : LUVs PC ; LUVs PC/SM 2:1 mol/mol; LUVs SM ; LUVs SM/Chol 1:1 mol/mol. Les courbes résultent de mesures ascendantes de température, aucune hystérésis significative n'a été observée dans les courbes correspondantes descendantes.

II.3.2 Extinction de fluorescence du C12NBD-PC dépendante de la concentration dans des membranes homogènes

La fluorescence spécifique du C12NBD-PC dans des LUVs PC/SM 2:1 mol/mol a été mesurée en fonction de la concentration moyenne (C_M) du fluorophore à différentes températures comprises entre 4 et 70°C, et reportée sur la figure II-11. Une diminution de la fluorescence consécutive à l'auto-extinction du C12NBD-PC en fonction de la concentration est clairement observée. Par exemple à 20°C, l'intensité de fluorescence spécifique de la sonde à 3 mol% est trois fois plus élevée que celle de la sonde à 9 mol%. On constate que cet effet est moins prononcé à de plus hautes températures à cause de l'environnement plus polaire de la sonde, comme expliqué dans le paragraphe précédent. Les points expérimentaux peuvent être présentés sous la forme de fonctions exponentielles (Brown et al., 1994),

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha C}, \text{ avec } C = C_M = C_L \text{ pour des membranes lipidiques homogènes} \quad (1)$$

Dans la figure II-11, I et I_0 sont exprimées en a.u. par μM de C12NBD-PC, et C en mol%. Les valeurs correspondantes pour I_0 et α sont données dans le tableau 2. L'intensité de fluorescence spécifique émise I permet de remonter à la valeur de C :

$$C(I) = 1/\alpha \ln(I_0/I) \quad (2)$$

Les courbes de calibration exprimant l'intensité de fluorescence du C12NBD-PC en fonction de sa concentration, et leurs fonctions associées vont donc pouvoir être utilisées afin de donner accès aux concentrations locales C_L en C12NBD-PC au niveau des membranes de composition hétérogène (PC/SM/Chol) dans lesquelles il est attendu que la concentration moyenne C_M est différente de la concentration locale C_L , d'après la mesure de la fluorescence spécifique du C12NBD-PC dans ces membranes hétérogènes.

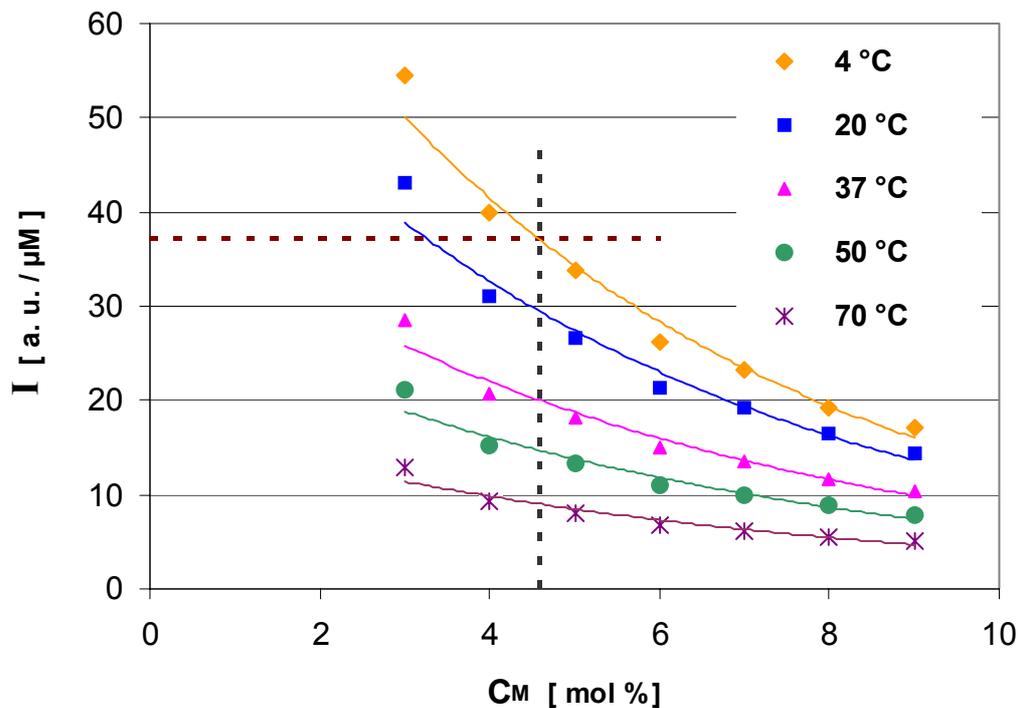


Figure II-11. Intensité de fluorescence spécifique du C12NBD-PC dans des membranes homogènes de LUVs de composition PC/SM 2:1 mol/mol en fonction de la concentration moyenne (C_M) du fluorophore à différentes températures comprises entre 4° et 70°C. Les points expérimentaux peuvent s'exprimer avec une fonction exponentielle (Brown et al., 1994). Le tracé des lignes qui se croisent donne la valeur d'une concentration locale (C_L) inconnue correspondant à une intensité de fluorescence spécifique I obtenue expérimentalement. L'exemple indiqué ici concerne la valeur I expérimentale obtenue pour des LUVs composées de PC/SM 2:1 et 20 mol% Chol à 4°C. $I = 37.16$ a.u./ μM , et $C_L = C_M(I) = 4.577$ mol%, d'après l'équation (10).

T	I_0 [a.u. / μM of PC*]	α [1 / mol%]	R^2
4	88.705	0.1901	0.9824
20	65.672	0.1746	0.9743
37	41.695	0.16	0.9697
50	30.058	0.1558	0.9612
70	17.769	0.1481	0.9497

Tableau 2. Paramètres des courbes de calibration, $I(C) = I_0 \cdot e^{-\alpha C}$ tirés des données expérimentales exposées dans la figure II-11 pour la fluorescence spécifique du C12NBD-PC dans des membranes de LUVs homogènes composées de PC/SM, 2:1 mol/mol, en fonction de la concentration moyenne en fluorophore, $C_M = C_L = C$ [mol %], à différentes températures. R^2 est le coefficient de corrélation. L'intensité de fluorescence I , donne accès à la valeur de C , dans le cas où $C = C(I) = 1/\alpha \ln(I_0/I)$.

II.4 Fluorescence du C12NBD-PC dans des membranes lipidiques hétérogènes présentant une coexistence de phase

II.4.1 Approche expérimentale

II.4.1.1 Mise en évidence de la coexistence de phase l_o/l_d sur des GUVs

Considérons une vésicule contenant du C12NBD-PC, de composition lipidique telle qu'elle présente des domaines en phase l_o dans une gamme de température se situant au-dessous de la température de miscibilité. Au-dessus de celle-ci, la membrane devient homogène et la concentration membranaire molaire moyenne du C12NBD-PC dans la membrane, C_M , est égale à la concentration membranaire locale, C_L , de la sonde dans n'importe quelle région de la membrane.

Des GUVs hétérogènes incluant la sonde C12NBD-PC ont été formées afin d'évaluer qualitativement la formation de domaines en phase l_o en fonction de la température et de la concentration en Chol. Lorsque la température diminue jusqu'en dessous de la température de miscibilité, des domaines en phase l_o se forment spontanément comme cela est illustré dans la figure II-12.A (A1→A2). Diminuer encore davantage la température conduit à une augmentation de la taille des domaines (Figure II-12.A : A2→A3→A4). Ceci signifie que la fraction membranaire en phase l_o (Φ_o) augmente, tandis que la fraction membranaire en phase l_d (Φ_d) correspondante diminue (puisque $\Phi_o + \Phi_d = 1$). De la même façon, à une température

donnée, lorsqu'on augmente la concentration en Chol, des domaines en phase l_o plus grands vont se former, et par conséquent une plus grande fraction Φ_o est obtenue. Pour une illustration qualitative, se référer à la figure II-12.B (température de 20°C, concentration en Chol de 0, 10, 20 et 35 mol%). Pour une GUV de composition PC/SM/Chol 41:20:35, nous pouvons noter que Φ_o est plus grande que Φ_d (Figure II-12.B4). Dans ce cas, la coexistence des deux phases liquides s'observe par la présence de domaines brillants en phase l_d baignant dans une membrane en phase l_o sombre et non plus par la présence de domaines sombres en phase l_o baignant dans une membrane brillante en phase l_d , comme observé précédemment. L'inversion de la phase majoritaire a lieu dans des GUVs de composition PC/SM/Chol 2:1: X où le contenu X en Chol est compris entre 20 et 35 mol%.

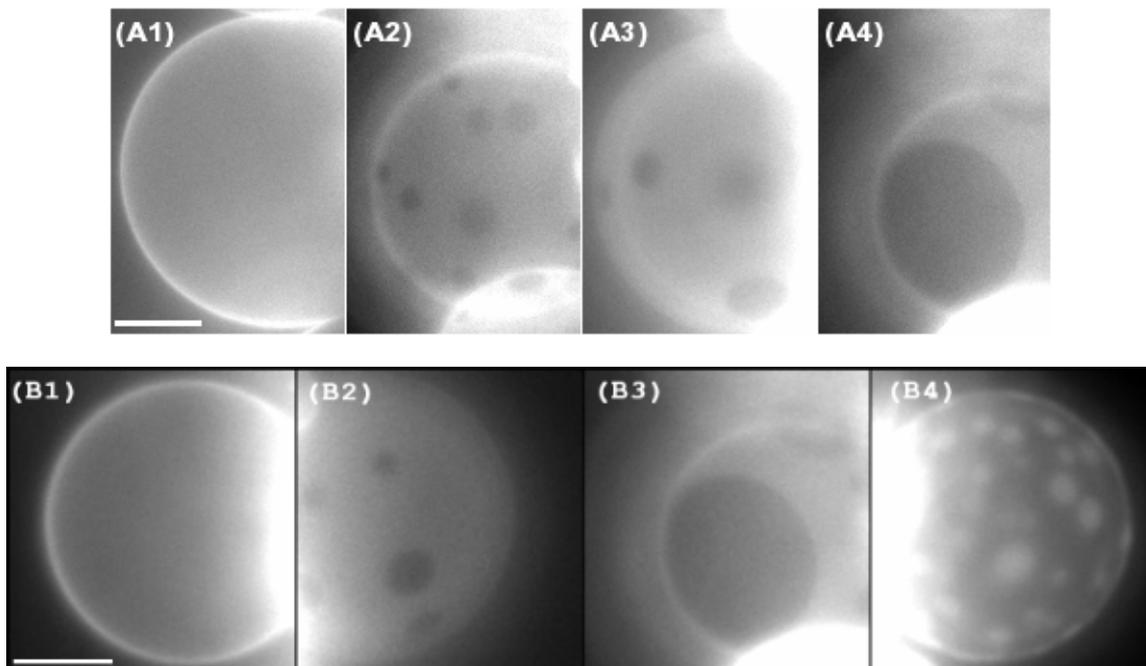


Figure II-12. Images de GUVs en fluorescence illustrant l'effet de la température (A1-A4) ou du contenu en Chol (B1-B4) sur l'importance de la fraction membranaire Φ_o , occupée par la phase l_o sur des vésicules membranaires. A1-A4, GUV formée de PC/SM/Chol 51:25:20 et 4 mol% C12NBD-PC montrant la formation progressive de domaines en phase l_o après diminution de la température au-dessous de la température de miscibilité. A1, 47°C, membrane homogène ; A2, 29°C, des domaines en phase l_o se sont formés, et sont visibles en tant que tâches sombres sur la membrane ; A3, 26°C ; et A4, 23°C, la fraction membranaire en phase l_o Φ_o augmente, pendant que celle en phase l_d Φ_d diminue avec le refroidissement. B1-B4, GUVs formées de PC/SM 2:1, 4 mol% C12NBD-PC, et Chol : B1, 0 mol% ; B2, 10 mol% ; B3, 20 mol% ; B4, 35 mol%, capture des images à 20°C. Notons que Φ_o est plus grand que Φ_d dans les GUVs contenant la plus haute proportion de Chol (B4).

II.4.1.2 Mise en évidence de la coexistence de phase l_o/l_d sur des LUVs

Le comportement de la phase l_o dans des préparations de LUVs a été étudié par fluorescence en soumettant les LUVs de composition PC/SM/Chol à des scans de fluorescence en fonction de la température. Un résumé des résultats obtenus est présenté dans la figure II-13. En principe, l'augmentation de la proportion de phase l_o dans les LUVs contenant du Chol résulte en une diminution correspondante de l'espace membranaire dans lequel la sonde C12NBD-PC partitionne, c'est-à-dire la phase l_d restante disponible. Nous pouvons observer ceci ici grâce à la diminution de l'intensité de fluorescence, pour une même température, en même temps que la phase l_o s'agrandit (Chol entrant en quantité croissante dans la composition des LUVs: 0 à 45 mol%), ce qui est interprété comme une auto-extinction de fluorescence du C12NBD-PC consécutive à l'augmentation locale de sa concentration dans la phase l_d . Une inflexion s'observe autour de 39°C qui doit correspondre à la température de miscibilité et à la formation de domaines en phase l_o lorsque l'échantillon est refroidi. En dessous de la température de transition de phase, en présence d'une séparation de phase, la concentration locale C_L du fluorophore dans la phase l_d sera plus grande que la concentration moyenne C_M . Donc dans cette interprétation, la fluorescence spécifique dans des LUVs hétérogènes (PC/SM/Chol 2:1:X) sera plus faible comparativement à celle de LUVs homogènes (PC/SM 2:1) mesurée à la même température. Et l'intensité de fluorescence spécifique I sera d'autant plus basse que la fraction molaire de Chol entrant dans la composition membranaire sera grande (X compris entre 0 et 45 mol%), conséquence de l'auto-extinction de fluorescence du C12NBD-PC en fonction de sa concentration.

Nous pouvons noter cependant que la relation « self-quenching » en fonction de la concentration en Chol n'est pas linéaire dans notre système. En effet, les valeurs de I sont similaires pour des quantités de Chol de 40 et 45 mol%, suggérant que la quantité de SM disponible pour former un complexe avec le Chol est limitée dans des LUVs contenant de si hautes proportions de Chol.

Lorsque la température de miscibilité est dépassée, et que les membranes adoptent une phase homogène, la diminution de fluorescence observée pour les différentes compositions de LUVs PC/SM/Chol ne sont plus le fait de la formation de domaines en phase l_o et de l'extinction de fluorescence du C12NBD-PC qui s'ensuit, mais sont le résultat de l'influence de l'environnement seul. Comme nous l'avons vu, l'augmentation de la température crée un

environnement plus polaire autour de la sonde, ce qui a comme conséquence de diminuer grandement la fluorescence du NBD. De plus les différences de fluorescence observées entre les LUVs de composition différente pour les hautes températures sont fortement réduites, tendant à prouver que la composition lipidique environnante influe peu sur l'intensité de fluorescence du NBD.

Une analyse des données de fluorescence a été réalisée pour fournir une estimation de la fraction membranaire Φ_0 se trouvant à l'état l_0 . Les différences entre les intensités spécifiques de fluorescence I mesurées pour des LUVs présentant une coexistence de phase l_0/l_d ont été utilisées. Dans des LUVs homogènes, en phase l_d seulement, des mesures ont été faites aux mêmes températures. Nous considérons que, tant que la sonde demeure incluse dans la phase l_d de la bicouche lipidique, les changements induits dans la fluorescence du NBD à cause de son environnement sont négligeables. La phase l_d , observée dans les bicouches présentant une coexistence de phase l_0/l_d , n'a pas une composition en phospholipides définie étant donné que la SM va préférentiellement se complexer avec le Chol, laissant une phase l_d enrichie en PC. Néanmoins, comme nous l'avons vu dans la figure II-10, les changements d'intensité spécifique de fluorescence dans les bicouches de LUVs sont faibles lorsque le ratio molaire SM/PC est compris entre 0 et 1:2. L'intensité spécifique de fluorescence du C12NBD-PC peut dès lors être utilisée pour fournir une estimation quantitative de la fraction membranaire de LUVs occupée par la phase l_0 , en fonction de la température et du ratio molaire PC/SM/Chol 2:1:X. Une analyse théorique est décrite ci-après.

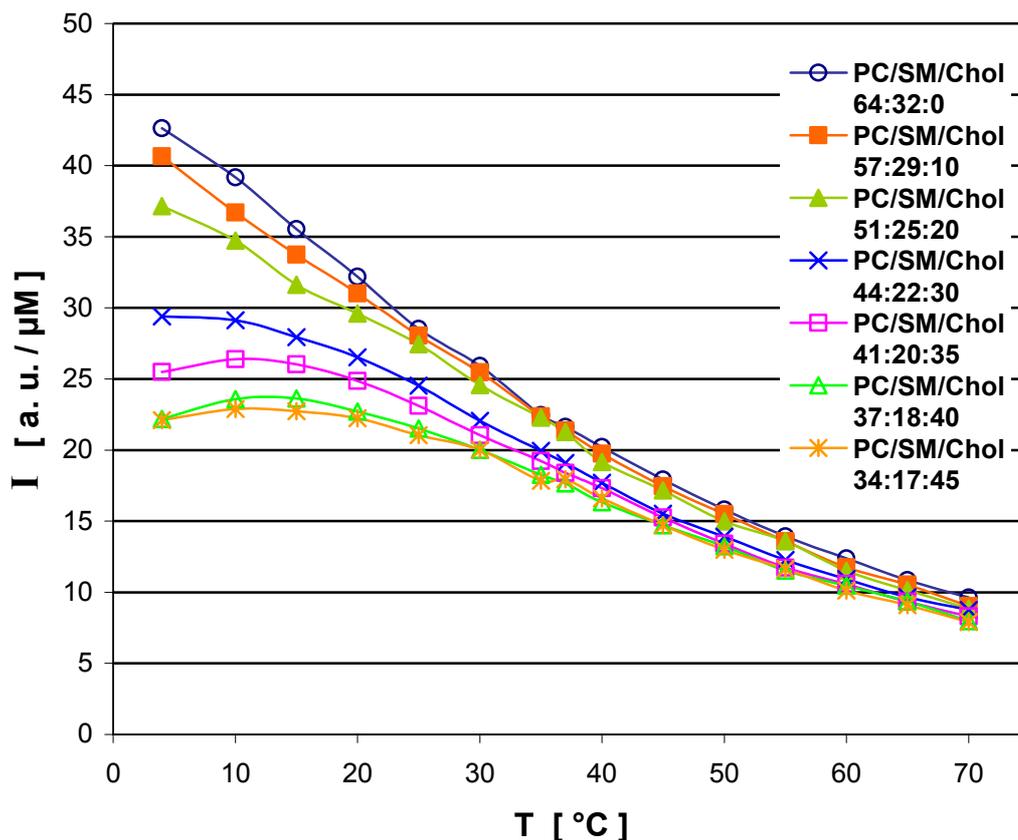


Figure II-13. Courbes montrant le maximum d'intensité spécifique de fluorescence I du C12NBD-PC en fonction de la température (en a.u par μM de C12NBD-PC) pour des LUVs PC/SM 2:1 renfermant 4 mol% C12NBD-PC, et différentes proportions de Chol, comme indiqué.

II.4.2 Approche théorique

Si nous considérons une vésicule lipidique homogène de surface S , d'aire moyenne par molécule A , contenant un nombre donné N de molécules de C12NBD-PC. La concentration molaire moyenne de C12NBD-PC (le nombre de molécules C12NBD-PC par molécule) est $C_M = N / N_T$. Le nombre total de molécules dans la vésicule, N_T , étant $N_T = S / A$. La présence de domaines en phase l_0 dans la bicouche restreint l'espace disponible pour les molécules de C12NBD-PC, qui partitionnent préférentiellement dans la phase l_d , comme cela a été expliqué dans le paragraphe précédent pour une vésicule hétérogène. Ceci correspond à une concentration locale C_L en C12NBD-PC plus grande dans la phase l_d . La concentration molaire locale de C12NBD-PC sera $C_L = N_d / N_{dT}$, où N_d est le nombre de molécules de C12NBD-PC dans la phase l_d et N_{dT} , le nombre total de molécules dans le domaine en phase

l_d . $N_{dT} = S_d / A_d$ où S_d / A_d sont, respectivement la surface membranaire et l'aire moyenne par molécule dans la phase l_d . En pratique, N_d est plus petit que N , à cause de l'exclusion non-idéale des molécules de C12NBD-PC de la phase l_o . En effet, un certain nombre de molécules de C12NBD-PC vont être présentes dans la phase l_o .

Pour une vésicule contenant N molécules de C12NBD-PC,

$$N = C_M \cdot (S / A), \quad \text{avec } C_L = C_M \text{ dans le cas d'une membrane homogène,} \quad (3)$$

$$N_d = C_L \cdot (S_d / A_d), \quad \text{avec } C_L \neq C_M \text{ dans le cas d'une coexistence } l_o / l_d \text{ dans la membrane,} \quad (4)$$

En divisant l'équation (4) par l'équation (3), on obtient :

$$S_d = S \cdot (C_M / C_L) \cdot (N_d / N) \cdot (A_d / A), \quad (5)$$

Ici (N_d / N) est ≤ 1 , et $(A_d / A) \cong 1$, aussi $S_d \leq S \cdot (C_M / C_L)$.

$S_d = S \cdot (C_M / C_L)$ représente la limite supérieure pour la surface membranaire occupée par la phase l_d .

De ce fait, une limite supérieure pour la fraction membranaire, $\Phi_d = S_d / S$, occupée par la phase l_d est définie et une limite inférieure est obtenue pour la fraction membranaire, $\Phi_o = S_o / S$, occupée par les domaines en phase l_o , respectivement :

$$\Phi_d = (C_M / C_L) \cdot (N_d / N) \cdot (A_d / A) \leq (C_M / C_L), \quad (6)$$

$$\Phi_o = 1 - (C_M / C_L) \cdot (N_d / N) \cdot (A_d / A) \geq 1 - (C_M / C_L), \quad (7)$$

$$(\Phi_o + \Phi_d = 1)$$

Quand il y a une partition idéale du C12NBD-PC dans les domaines en phase l_d (toutes les molécules sont restreintes aux domaines en phase l_d , i.e., $N_d / N = 1$), et en admettant $A_d = A$, on obtient :

$$\Phi_d = (C_M / C_L), \quad (8)$$

$$\Phi_o = 1 - (C_M / C_L), \quad (9)$$

Il apparaît donc que la mesure expérimentale de la concentration locale de C12NBD-PC C_L dans la phase l_d permet l'estimation des fractions membranaires, Φ_o et Φ_d , occupées par les phases l_o ou l_d respectivement.

II.4.3 Estimation quantitative des fractions membranaires Φ_o et Φ_d , occupées par les phases l_o et l_d en utilisant les courbes de calibration

Les courbes expérimentales présentées dans la figure II-11 sont des courbes de calibration pour la fluorescence spécifique du C12NBD-PC dans des membranes de LUVs composées de PC/SM 2:1 mol/mol, pour des concentrations de la sonde fluorescente comprises entre 3 et 9 mol% pour une gamme de températures allant de 4° à 70°C.

Considérons maintenant les courbes de la figure II-13 dans ce contexte. Tous les échantillons de LUVs contiennent 4 mol% de C12NBD-PC en concentration moyenne C_M . Au-dessus de la température de miscibilité, tous les échantillons ont $C_L = C_M = C$. Au-dessous de cette température, les LUVs contenant du Chol montrent des coexistences de phase membranaire l_o/l_d . Dans ce dernier cas, l'intensité spécifique globale d'un échantillon I sera la somme des intensités provenant des différents types de domaines membranaires portant différentes concentrations locales de C12NBD-PC et intensités spécifiques de fluorescence. S'il est admis qu'il y a une partition idéale du C12NBD-PC dans la phase l_d , toute la fluorescence proviendra des domaines membranaires en phase l_d , $S_d = \Phi_d \cdot S$, avec la concentration en C12NBD-PC, C_L , supérieure à 4 mol%.

D'après le modèle théorique développé, la même intensité spécifique de fluorescence I , serait émise par un échantillon de LUVs en phase l_d homogène. D'après les équations (1) et (2), avec une concentration moyenne en C12NBD-PC, $C_M = C_L$:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha C_L}, \text{ ou, } C_L(I) = 1/\alpha \ln(I_0/I), \text{ où } C_L > 4 \text{ mol\%} \quad (10)$$

Où α et I_0 sont donnés dans le tableau 2.

Une méthode graphique pour obtenir $C_L = C_L(I)$ est donnée en exemple dans la figure II-11 (voir les lignes en tirets) pour des LUVs constituées de PC/SM 2:1, et 20 mol% Chol à 4°C. Pour la valeur mesurée $I = 37.16$ a.u./ μM , et d'après la courbe de calibration (i.e., d'après l'équation (6) à 4°C), la concentration correspondante $C_L(I) = 4.577$ mol% est obtenue. Cela donne, utilisant les équations (8) et (9) : $\Phi_d = 0.874$, et $\Phi_o = 0.126$. L'erreur expérimentale dans l'estimation des fractions membranaires a été de ± 0.035 .

La concentration locale de C12NBD-PC dans la phase l_d résultant de la création de domaines en phase l_o peut aussi être évaluée d'une autre façon. Comme les intensités spécifiques de fluorescence de LUVs homogènes mesurées expérimentalement dépendent de

la concentration en C12NBD-PC, C_M , alors pour une fluorescence spécifique mesurée I d'une LUV de composition définie, la concentration locale correspondante $C_L = C_L(I)$ peut être obtenue. Dans l'exemple où $C_M = 4$ mole% :

$$C_L(I) / C_{4\%} = \ln(I_0/I) / \ln(I_0/I_{4\%}), \quad (11)$$

En fait, les équations (10) et (11) donnent toutes deux $C_L = C_L(I)$, et peuvent être utilisées pour obtenir Φ_d et Φ_o à partir des équations (8) et (9).

L'utilisation de l'équation (11) permet l'expression de la fraction de phase membranaire Φ_o comme une fonction du contenu en Chol en admettant $\Phi_o = 0$ pour l'échantillon avec 0% de Chol. Par exemple, en appliquant (11) pour le cas exposé sur la figure II-11, nous obtenons :

$$I = 37.17 \text{ a.u./}\mu\text{M}; \quad I_{4\%} = 42.6 \text{ a.u./}\mu\text{M}; \quad C_L / C_{4\%} = 1.19; \quad C_L = 4.75 \text{ mol } \%; \quad \Phi_d = 0.842; \quad \Phi_o = 0.158.$$

Si on considère l'erreur expérimentale liée à la première estimation (± 0.035), la différence de résultats obtenus n'est pas surprenante.

En admettant une partition idéale du C12NBD-PC (coefficient de partition de la sonde C12NBD-PC entre la phase l_o et la phase l_d $k_p = 0$) dans les domaines en phase l_d , la figure II-14.A montre la fraction membranaire occupée par la phase l_o , Φ_o (en $\Phi_o \times 100\%$), pour des LUVs PC/SM/Chol 2:1: X contenant entre 0 et 45 mol% Chol, à 4, 20, et 37°C. Φ_o a été calculée en utilisant l'équation (9) avec $C_L(I)$ provenant de l'équation (11).

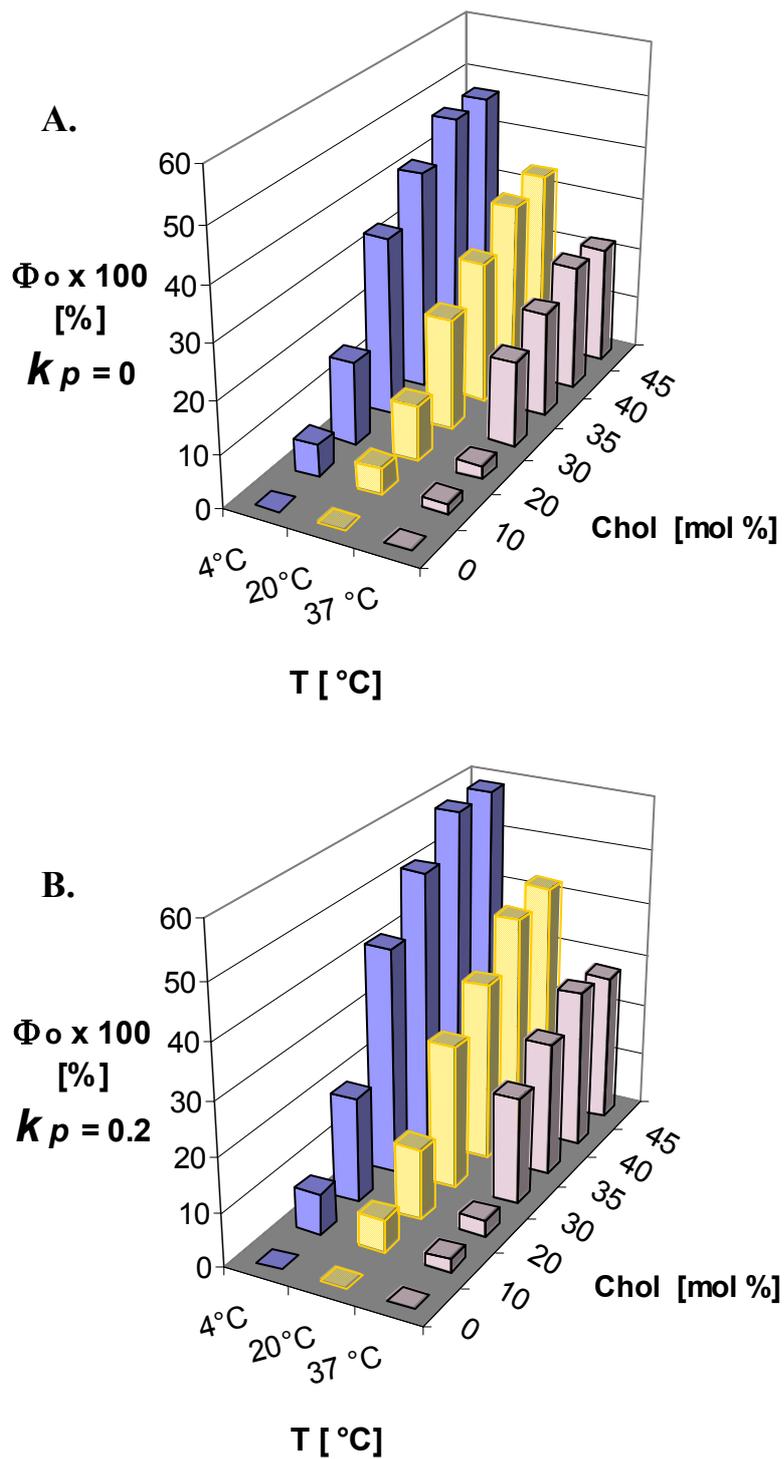


Figure II-14. Fraction membranaire occupée par la phase l_o , Φ_o (en $\Phi_o \times 100\%$), pour des LUVs PC/SM/Chol 2:1:X contenant entre 0 et 45 mol% Chol, à 4, 20, et 37°C. Φ_o a été calculée en utilisant l'équation (9) avec $C_L(I)$ provenant de l'équation (11). (A) : Dans le cas d'une partition idéale du C12NBD-PC dans les domaines en phase l_d ($k_p = 0$) ; (B) : Dans la cas d'une partition non-idéale : les molécules de C12NBD-PC partitionnent à des concentrations molaires différentes entre les phases l_d et l_o , préférant la phase membranaire l_d avec un coefficient de partition $k_p = 0.2$, équation (13). L'erreur expérimentale absolue pour l'estimation des fractions membranaires (en %) a été de $\pm 3.5\%$.

En pratique, les molécules de C12NBD-PC partitionnent dans des concentrations molaires différentes entre les deux phases mais avec une préférence pour la membrane en phase l_d . Ceci est observé directement par fluorescence à partir de LUVs (Figure II-12). Les fractions membranaires, Φ_o , ainsi obtenues sont plus grandes que celles de la figure II-14.A. La différence de grandeur va dépendre du ratio entre les concentrations molaires de C12NBD-PC dans les phases l_o et l_d coexistantes, c'est-à-dire du coefficient de partition k_p . Une étude systématique de la partition des amphiphiles entre les phases ordonnées et désordonnées coexistantes dans des membranes de bicouches lipidiques biphasiques a été réalisée (Mesquita et al., 2000). Un coefficient de partition $k_p \cong 0.2$ a été obtenu pour différents lipides marqués au NBD dans un système membranaire semblable.

En prenant en compte $k_p \neq 0$, les équations (8) et (9) sont remplacées respectivement par :

$$\Phi_d = [(C_M / C_L) - k_p] / (1 - k_p), \quad (12)$$

$$\Phi_o = [1 - (C_M / C_L)] / (1 - k_p), \quad (13)$$

En admettant que $k_p \cong 0.2$ pour le C12NBD-PC, par exemple, pour des LUVs PC/SM (2:1) et Chol 20 mol%, à 4°C, nous obtenons $\Phi_d = 0.842$ et $\Phi_o = 0.158$, au lieu des valeurs $\Phi_d = 0.874$ et $\Phi_o = 0.126$, obtenues précédemment pour le cas d'une partition idéale ($k_p = 0$), et une erreur expérimentale d'environ ± 0.035 .

II.5 Reproductibilité des préparations de LUVs et des scans de température

Les résultats quantitatifs présentés ci-dessus se sont montrés être très sensibles à de petites variations dans la procédure expérimentale. D'une part, les échantillons de LUVs doivent être préparés et traités d'une manière identique que ce soit dans la composition lipidique, les conditions d'extrusion, ou dans les mesures d'intensité de fluorescence des échantillons dilués. Par exemple, les concentrations des solutions lipidiques stock doivent être vérifiées régulièrement en raison des changements possibles dus à l'évaporation du solvant organique. Une attention particulière doit être portée aux solutions de NBD-PC étant donné que l'évaporation de solvant, la lumière ou un chauffage accidentel sont susceptibles de causer une variation énorme de l'intensité spécifique de fluorescence. Le suivi scrupuleux de la procédure expérimentale a rendu possible la mesure de l'intensité de fluorescence avec une

erreur relative de moins de 8 % aux conditions où les échantillons étaient préparés à partir de la même solution lipidique stock et mesurés à la même concentration lipidique totale (0.5 mM).

D'autre part, les scans de température effectués en montant et en descendant la température se sont avérés identiques dans notre précision expérimentale (voir la figure II-15). Aussi d'éventuelles hystérésis, tout comme l'effet possible de dégradation des lipides ou de la sonde fluorescente par les hautes températures ont été considérés comme négligeables dans nos résultats. Les scans de température obtenus après chauffage et refroidissement réalisés sur des LUVs composées de PC/SM/Chol 2:1:X, ou de SM seulement ou de SM/Chol 1:1 sont présentés. Les mesures à 4°C ont été les plus sensibles à l'erreur expérimentale. De plus, il doit être mentionné que les LUVs contenant du Chol tendent à agréger après quelques jours à 4°C.

Les résultats concernant les LUVs composées de 25 mol% Chol (PC/SM/Chol/C12NBD-PC 47:24:25:4 mol/mol) ont été les plus difficiles à reproduire, l'erreur relative étant d'environ 15%. Une explication possible peut être que ce mélange est proche de la concentration limite en Chol pour laquelle la percolation des phases l_d/l_o se produit dans les membranes de LUVs. C'est-à-dire, la coexistence des deux phases liquides se présente alors comme des domaines en phase l_d baignant dans une membrane en phase l_o , et non plus comme des domaines en phase l_o baignant dans une membrane en phase l_d . Pour une illustration d'une situation semblable dans les GUVs, se référer à la figure II-12.B4. A ce point critique de la composition, de petites variations dans la concentration en Chol entre les différentes vésicules pourraient mener à de grandes différences d'intensité de fluorescence globale de l'échantillon. Nous n'avons donc pas considéré cette composition pour des estimations quantitatives.

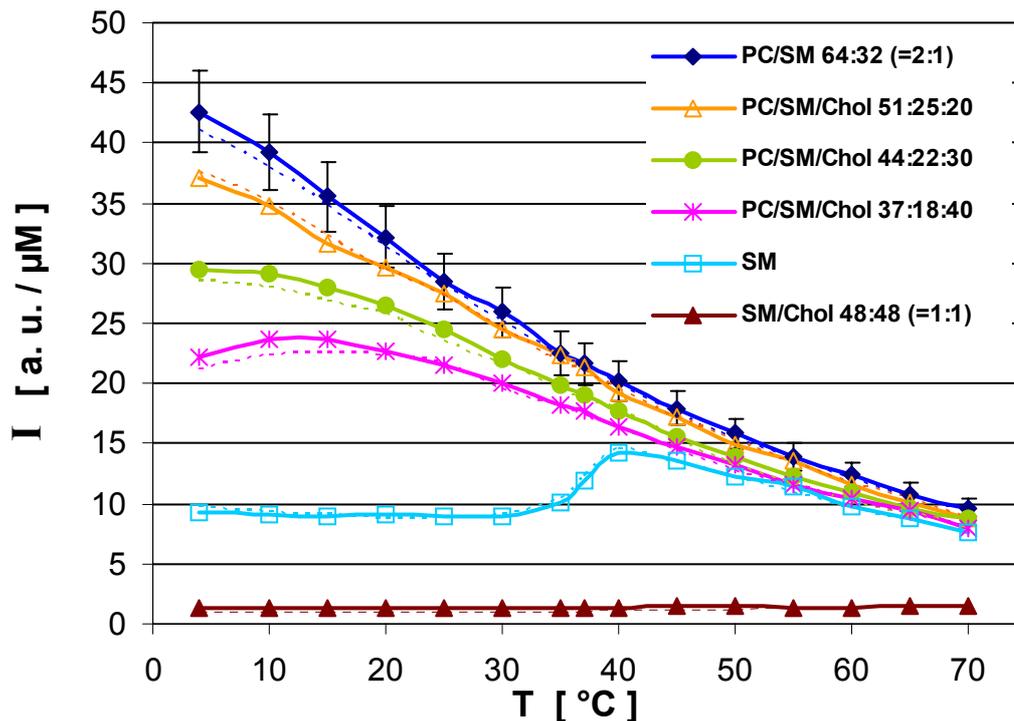


Figure II-15. Courbes montrant la dépendance à la température de l'intensité maximale de fluorescence spécifique du C12NBD-PC (intensité I en a.u. par μM de C12NBD-PC) pour des LUVs contenant 4 mol% C12NBD-PC pour des mesures réalisées après montée de la température (courbes continues) et refroidissement (courbes en pointillés). Les courbes obtenues après refroidissement peuvent être considérées comme identiques à celles obtenues après chauffage (pour les compositions lipidiques présentées dans le graphique), dans notre précision expérimentale de 8%.

II.6 Discussion

Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en évidence une coexistence de phase liquide désordonnée (l_d), et liquide ordonnée (l_o) sur des LUVs de composition hétérogène à partir d'une sonde fluorescente capable d'auto-extinction. Grâce à une différence de partition de la sonde entre les deux phases, l'intensité de fluorescence émise par la sonde, pour différentes tailles de la fraction en phase l_o , a été utilisée pour la quantification de la fraction membranaire occupée par la phase l_o . Ce travail démontre ainsi dans le cas des LUVs, que l'émission de fluorescence provenant d'une sonde fluorescente unique partitionnant entre les domaines liquides dans la membrane peut être présentée sous la forme d'un modèle simple. Le modèle peut être appliqué pour obtenir une estimation quantitative des fractions

membranaires caractérisant la coexistence de deux phases liquides l_o/l_d . L'approche utilisée est semblable à celle rapportée par Brown et collaborateurs (Brown et al., 1994), qui ont expliqué quantitativement les changements observés dans l'intensité relative et les propriétés de durée de vie de la sonde NBD dans les membranes lipidiques par les propriétés d'auto-extinction de fluorescence de cette sonde à hautes concentrations locales. Les modèles de membranes choisies pour leur étude étaient des SUVs et des monocouches de PC d'œuf, contenant différentes concentrations de NBD-PE, et étaient supposées permettre une distribution homogène du fluorophore. Ils ont noté que les concentrations effectives ou « locales » du fluorophore dans les structures membranaires hétérogènes pouvaient être obtenues à partir des mesures d'intensité de fluorescence.

Dans ce travail, des membranes modèles de type LUV de structure membranaire hétérogène, composées d'un mélange lipidique ternaire de PC, SM et Chol ont été utilisées. Pour l'estimation quantitative de la fraction membranaire occupée par la phase l_o , Φ_o présentée dans la figure II-14.A, il a été admis que la sonde partitionnait idéalement dans les domaines en phase l_d et était complètement exclue des domaines en phase l_o (coefficient de partition $k_p = 0$). Par conséquent, une limite inférieure pour la fraction membranaire, $\Phi_o = S_o / S$, occupée par les domaines en phase l_o a été obtenue ($\Phi_o = 0.126$ à 4°C). Cependant en pratique, les molécules de C12NBD-PC se distribuent dans les deux phases, avec cependant une préférence pour la membrane en phase l_d . Nous nous sommes approchés de ces conditions non idéales en choisissant une valeur de coefficient de partition $k_p \cong 0.2$, ayant été obtenu pour différents lipides marqués au NBD dans un système membranaire semblable. Pour la même composition de LUVs et la même température, la valeur de fraction membranaire occupée par la phase l_o a été dans ce cas : $\Phi_o = 0.158$.

Une des applications possibles de ce travail concerne la caractérisation des préparations de DRMs isolées à partir de membranes contenant putativement des domaines en phase l_o . L'approche quantitative de l'estimation des fractions occupées par les domaines pourrait également être utile pour établir la relation entre la formation, la stabilité et la coexistence de phases liquides lamellaires, l_o et l_d dans des modèles de membranes.

III. Comment extraire sélectivement les domaines en phase l_0 de vésicules unilamellaires de type LUVs à l'aide de Triton X-100 ?

III.1 Introduction

Les interactions des détergents avec les membranes ont été activement étudiées ces dernières années après la mise en évidence de l'utilité de la solubilisation par les détergents pour l'isolement et la caractérisation des protéines membranaires (Helenius and Simons, 1975; Lichtenberg et al., 1983). Plus récemment, il a été montré que les détergents étaient capables de solubiliser différemment des domaines membranaires dans des états physiques différents (Brown and London, 1998). La découverte de ces membranes résistantes à l'extraction par les détergents (les DRMs) a conduit à une nouvelle description de la membrane cellulaire insistant sur les propriétés d'auto-organisation de certains lipides, lesquelles conduisent à la formation de domaines spécialisés appelés radeaux ou « rafts » (Rietveld and Simons, 1998). Les différents environnements lipidiques mènent à une distribution inhomogène des protéines membranaires, aussi cette organisation latérale est supposée jouer un rôle prépondérant dans la transmission des signaux cellulaires (Sharma et al., 2002; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000). La mesure de l'insolubilité des lipides dans les détergents est ainsi devenue une méthode de choix pour sonder les membranes lipidiques d'un point de vue structural. L'observation de l'enrichissement des DRMs en SM et Chol a représenté une autre découverte importante (Ahmed et al., 1997). Pour certaines compositions, et dans certains intervalles de température, les membranes modèles présentent également une séparation de phase entre la phase liquide désordonnée et la phase liquide ordonnée riche en SM et Chol (de Almeida et al., 2003; Dietrich et al., 2001a; Sankaram and Thompson, 1990). A cause de ces similarités, les radeaux ont été supposés comme étant également en phase l_0 (London and Brown, 2000; McMullen et al., 2004) bien que la composition de ces derniers puisse être variable, d'après les diagrammes de phase réalisés sur des bicouches lipidiques modèles. Dans tous les cas, ces résultats ont stimulé de nombreuses études sur les membranes lipidiques artificielles présentant une coexistence de phase l_0/l_d , qui représentent un modèle minimal de membranes contenant des domaines « raft-

like » (Dietrich et al., 2001a; Kahya et al., 2005; Puff et al., 2005; Staneva et al., 2004; Veatch and Keller, 2002).

Malgré tous ces éléments, les radeaux des membranes biologiques demeurent encore mystérieux en tant qu'entités structurales, à tel point que leur existence même est débattue (Edidin, 2003b; McMullen et al., 2004; Munro, 2003). Des approches directes non destructrices (microscopie à fluorescence, ou SPT par exemple) ont été utilisées mais n'ont pas encore donné de résultats entièrement satisfaisants (Harder et al., 1998; Pralle et al., 2000; Subczynski and Kusumi, 2003). L'approche utilisant les détergents, identifiant les radeaux comme DRMs, c'est-à-dire des fractions de membrane qui résistent à la solubilisation par des détergents (Triton X-100, Brij 98, LUBROL...) conduit potentiellement à un ensemble de problèmes. D'abord, la réalisation de l'extraction par les détergents à basse température (4°C) peut mener à une surestimation de la quantité de radeaux. De basses températures peuvent en effet modifier l'état physique des lipides des membranes cellulaires en augmentant, voire même en induisant des séparations de phase lipidique latérale, qui n'étaient pas présentes à 37°C (McMullen et al., 2004). De plus, la composition et les proportions en lipides et protéines retrouvées dans les DRMs dépendent fortement de la nature du détergent employé et des conditions expérimentales (Schuck et al., 2003). Une question importante émerge donc sur la capacité des DRMs à constituer une mesure fidèle de la quantité de domaines « rafts » avant l'addition de détergent. Pour répondre à cette question, les modèles de membrane lipidique présentant une coexistence de phase l_0/l_d apparaissent utiles. Le degré d'insolubilité des lipides dépend de la stabilité des interactions lipides-lipides comparées à celle des interactions lipides-détergent. Un système minimal composé exclusivement de PC, SM, et Chol peut mener à une meilleure compréhension du processus d'extraction par les détergents, qui consiste en fait en une solubilisation sélective de la bicouche lipidique (Heerklotz, 2002; Keller et al., 2005; Schnitzer et al., 2005; Sot et al., 2002; Staneva et al., 2005).

La solubilisation des membranes lipidiques homogènes est habituellement décrite comme un processus à trois étapes (Lichtenberg et al., 2000). Dans la première étape, à faible rapport effectif détergent/lipides, le détergent est distribué entre le milieu aqueux et la bicouche lipidique. Lorsqu'une première concentration molaire critique en détergent est atteinte, des micelles mixtes de détergent et lipides apparaissent et coexistent avec des membranes saturées en détergent. Il s'agit d'une étape de solubilisation partielle ou incomplète. La troisième étape est atteinte quand la solubilisation complète des membranes a lieu et toutes les membranes se micellisent. Le paramètre clé contrôlant le degré de

solubilisation est le rapport effectif détergent/lipides qui dépend fortement de l'état physique de la bicouche lipidique et par conséquent de la composition lipidique et de la température (Heerklotz, 2002; Schnitzer et al., 2003; Sot et al., 2002). La situation devient plus complexe, mais plus pertinente biologiquement, quand la bicouche présente une coexistence de phase l_o/l_d parce que les différentes interactions entre phases lipidiques et détergent doivent être considérées. Il a été montré que les domaines membranaires en phase l_o étaient plus résistants à la solubilisation par les détergents que les domaines en phase l_d , conséquence d'interactions spécifiques entre SM et Chol (Sot et al., 2002). Cette observation est cohérente avec l'idée largement répandue que « les DRMs = domaines l_o ». Cependant Heerklotz et collaborateurs (Heerklotz, 2002; Heerklotz et al., 2003; Keller et al., 2005) ont démontré que le Triton X-100 pouvait favoriser, et même induire, la formation de domaines membranaires en phase l_o . Des interactions non idéales entre les détergents et les lipides « préférant l'ordre » (en particulier les sphingolipides) sont une force motrice possible pour un tel effet. Au regard de ces controverses, l'utilisation de la méthode d'extraction par les détergents, dans le but d'évaluer la structure des domaines et la composition lipidique avant l'addition de détergent n'a pas fourni encore de réponses définitives à la question de l'existence des radeaux.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux transitions de structure induites par l'interaction du Triton X-100 avec des vésicules unilamellaires de type LUVs à 4°C. Pour cela, nous avons suivi une procédure de fractionnement après gradient de densité de sucrose, semblable à celle utilisée pour isoler les DRMs biologiques. L'analyse du « niveau de flottement » des structures lipidiques après centrifugation a été faite sur la base du contenu en [1α , 2α (n)- ^3H]Cholesterol (^3H Chol) de chaque fraction (1 à 10) d'un gradient de densité de sucrose 40-35-5%. Nous avons mesuré des quantités de fractions flottantes insolubles au Triton X-100 (TIFFs) pour différents rapports détergent/lipides et pour différents états physiques des bicouches lipidiques. Nos résultats montrent que selon le rapport détergent/lipides, il est possible d'obtenir des fractions flottantes insolubles ou une solubilisation complète des membranes lipidiques à deux composants (PC/SM 2:1 mol/mol) et des membranes hétérogènes (coexistence de phase l_o/l_d). Toutefois, lorsque la membrane présente une coexistence de phase l_o/l_d , le processus de solubilisation est beaucoup plus complexe. Nous avons interprété nos résultats en considérant les dernières observations de notre groupe (Staneva et al., 2005). Nous avons tenté d'évaluer le rapport approprié détergent/lipides nous permettant d'isoler les TIFFs correspondant le mieux aux domaines en phase l_o existant au niveau de la membranes des LUVs avant l'addition de détergent.

III.2 Méthodologie

III.2.1 Matériels utilisés

Les études de solubilisation des membranes par détergent ont été effectuées sur des membranes lipidiques modèles composées des espèces lipidiques suivantes:

1. Egg yolk phosphatidylcholine (PC) (phosphatidylcholine de jaune d'œuf) ; Sigma. Composition : C16:0 : 34%, C18:0 : 11%, C16:1 : 2%, C18:1 : 32%, C18:2 : 18%, C20:4 : 3%. Poids moléculaire : 760.09 g/mol.
2. Egg yolk sphingomyelin (SM) (sphingomyéline de jaune d'œuf) ; Sigma. Composition : C16:0 : 84%, C18:0 : 6%, C20:0 : 2%, C22:0 : 4%, C24:0 : 4%. Poids moléculaire : 703.04 g/mol.
3. Chol (Chol) ; Sigma. Poids moléculaire : 386.66 g/mol.
4. Chol radiomarqué: $[1\alpha, 2\alpha (n)-^3\text{H}]$ Cholesterol ($[^3\text{H}]$ Chol), (35 Ci/mmol); Amersham Biosciences.

Le détergent non ionique utilisé était :

Triton X-100 (TX-100) ; Sigma. Poids moléculaire : 647 g/mol (quand $x = 10$)

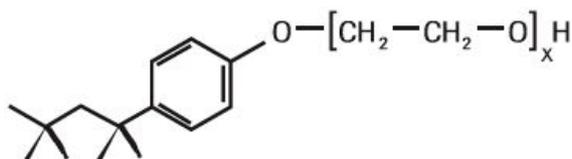


Figure III-1. Formule chimique du Triton X-100.

III.2.2 Préparation des liposomes

Les vésicules unilamellaires de type LUVs ont été préparées par la méthode d'extrusion (MacDonald et al., 1991), selon la même procédure que dans la partie II.2. Cependant au lieu d'un tampon HEPES pour hydrater le film lipidique et former des MLVs, nous avons utilisé ici un tampon TNC (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM pH

7.5), de façon à obtenir une concentration lipidique de 1 mM. Ce tampon a été utilisé car il est bien adapté à l'étude sur des objets biologiques, ce qui était envisagé dans ce travail. De plus, afin d'assurer le suivi de répartition selon leur densité des différentes fractions membranaires obtenues après action du détergent, nous avons préparé des LUVs radiomarquées. Ceci requiert l'addition de [³H]Chol de façon à obtenir une concentration finale de 1 µCi/ml dans les mélanges lipidiques avant dessiccation. Dans les systèmes binaires et ternaires composés de PC/SM ou PC/SM/Chol, le rapport PC/SM est toujours 2:1 mol/mol.

III.2.3 Obtention de « Triton X-100 insoluble floating fractions » (TIFFs)

Les fractions flottantes insolubles au Triton X-100 ont été obtenues à partir de LUVs contenant du [³H]Chol (0.8 ml, 300 µM de lipides) par traitement avec différents pourcentages de TX-100 (w/v) comme indiqué, dans du tampon TNC (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM pH 7.5), à 4°C pendant 30 minutes. Ensuite, l'échantillon détergent-LUV a été mélangé avec 0.8 ml d'une solution de sucrose 80% (w/v), elle-même préparée dans du tampon TNC, afin d'obtenir une concentration finale de 40% de sucrose dans un volume de 1.6 ml, puis le mélange a été déposé au fond d'un tube d'ultracentrifugation. Une couche de 1.6 ml de solution de sucrose 35% (w/v), puis une couche de 1.6 ml de solution de sucrose 5% (w/v) (toutes deux préparées dans du TNC) ont été successivement déposées délicatement dans le tube d'ultracentrifugation afin d'établir le gradient de densité. Après avoir été parfaitement équilibrés un à un, les gradients ont été soumis à une ultracentrifugation dans un rotor Beckman SW 55 Ti pendant 18h à 180 000 x g, à 4°C.

Après la centrifugation, des fractions de 500 µl ont été collectées, à partir du haut du gradient (Figure III-2). Des aliquots ont été prélevés et additionnés à du liquide scintillant pour déterminer la quantité de [³H]Chol contenue dans chaque fraction par comptage à scintillation. Les expériences ont été reproduites au moins deux fois. Les résultats sont reproductibles si les différentes fractions après ultracentrifugation sont soigneusement collectées.

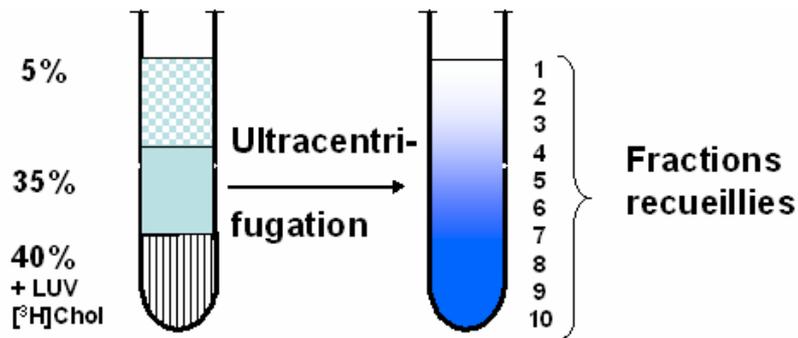


Figure III-2. Schéma représentant l'établissement du gradient de densité continu de sucrose.

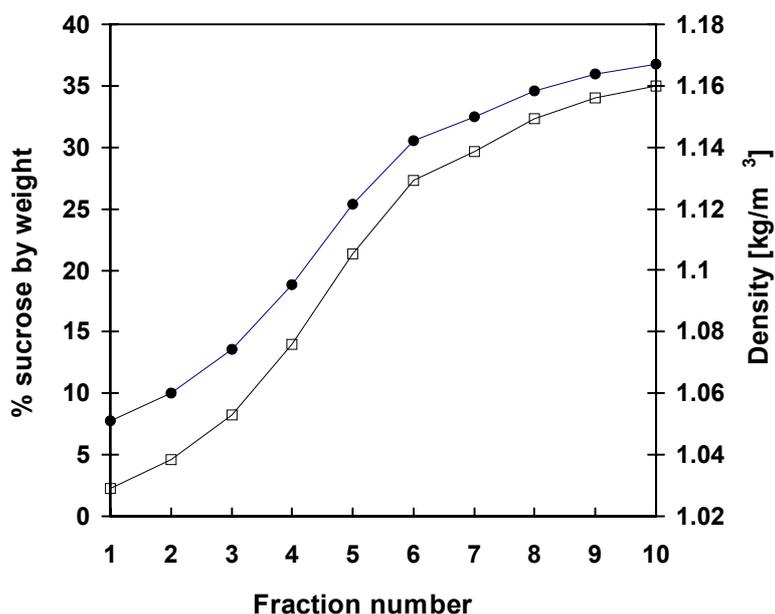


Figure III-3. Pourcentage de sucrose en masse (●) et densité (□) de chaque fraction issue du gradient après centrifugation. L'indice de réfraction et le pourcentage de sucrose ont été lus à l'aide d'un réfractomètre. Les densités correspondantes ont été déterminées ensuite à l'aide d'un index de densité de sucrose.

Pour 0.75% TX-100 (w/v), aucune variation significative du contenu en [³H]Chol n'a été détectée pour des traitements des LUVs à des durées différentes : 5, 15, 30, 120 minutes. Pour évaluer la densité de chaque fraction collectée, l'indice de réfraction et le pourcentage en sucrose fonction de la masse ont été mesurés à l'aide d'un réfractomètre (Atago). Les densités correspondantes ont été ensuite déterminées en utilisant un tableau de densité de sucrose. Le pourcentage de sucrose de chaque fraction prélevée et la densité correspondante sont représentés sur la figure III-3. On remarque que la centrifugation a donné lieu à un gradient continu de sucrose.

III.3 Evaluation de la présence de fractions flottantes insolubles au Triton X-100 (TIFFs) dans les LUVs

Pour évaluer la présence de membranes résistantes au détergent TX-100 dans les liposomes, des LUVs (300 μ M de lipides) ont été traitées avec du TX-100 à 4°C pendant 30 minutes et soumises à un fractionnement après gradient de densité. Les fractions insolubles au TX-100 flottent au sommet du gradient de densité de sucrose 40-35-5 % et sont détectées grâce à la présence de [3 H]Chol incorporé initialement dans les LUVs.

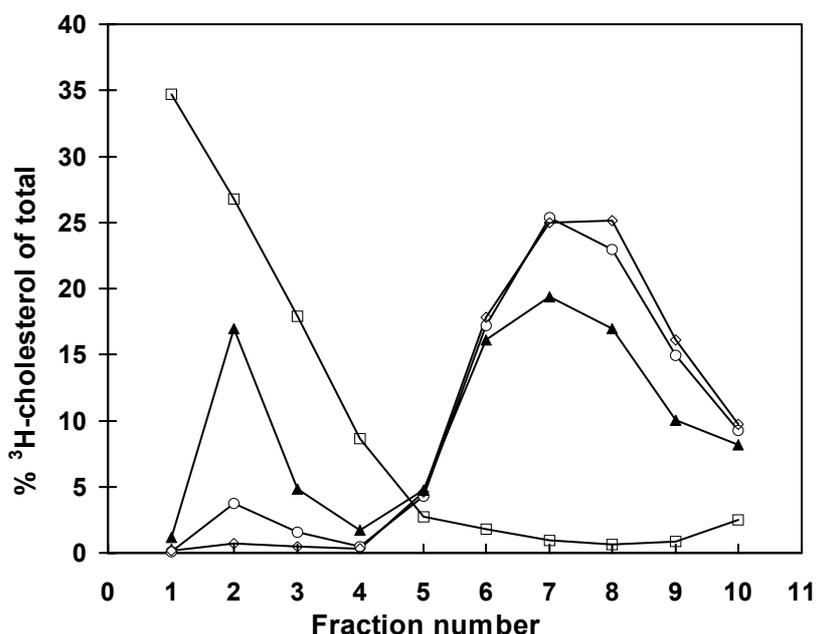


Figure III-4. Analyse par fractionnement après gradient de densité de sucrose des membranes résultant du traitement de LUVs (300 μ M de lipides) à 4°C par différents pourcentages de TX-100 (w/v) : (□) 0% LUVs PC/SM 2:1 mol/mol. (○) 0.8% LUVs PC/SM 2:1 mol/mol. (▲) 0.8% LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol. (◇) 1.3 % LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol. Le contenu en [3 H]Chol de chaque fraction (1-10) est une signature de la répartition des structures lipidiques après centrifugation. La densité correspondante à chaque fraction est indiquée sur la figure III-3.

Sans l'action de TX-100 sur les vésicules (Figure III-4, données □), pratiquement 90 % du contenu en [3 H]Chol total a été retrouvé dans les quatre premières fractions (1-4). Ces fractions contenant les vésicules correspondent aux fractions de plus basses densités du gradient de sucrose (Figure III-3). Ceci s'explique probablement par la très faible perméabilité membranaire pour le sucrose en absence de détergent. Ainsi les vésicules contenant le tampon de préparation flottent simplement dans la solution de sucrose. Les 10 % de [3 H]Chol restants

distribués entre les fractions 5 à 10 doivent provenir de micelles ou de « structures de hautes densités » existant après le processus d'extrusion et qui demeurent au fond du tube d'ultracentrifugation. En conséquence, le contenu en [^3H]Chol mesuré pour les fractions 5 à 10 en l'absence de TX-100 a été considéré comme « bruit de fond » et soustrait systématiquement du contenu total en [^3H]Chol.

Lorsque du TX-100 a été rajouté aux vésicules dans des quantités n'entraînant pas leur solubilisation complète, le contenu en [^3H]Chol total a pu être séparé en deux parties majeures (Figure III-4, données \blacktriangle et \circ). La première, correspondante aux fractions 1 à 4, c'est-à-dire aux densités 1.029-1.076 kg/m³ (Figure III-5), a été considérée comme celle rassemblant les TIFFs (« Triton insoluble floating fractions »). La seconde (fractions 5-10, densités 1.105-1.160 kg/m³) rassemble les fractions membranaires solubles par le détergent et est composée principalement de micelles d'un mélange détergent-lipides. Un exemple est donné sur la figure III-5 pour 0.8 % TX-100 (w/v) et deux sortes de liposomes (de composition PC/SM 2 :1 mol/mol additionnée de 0% ou 20% Chol). Si nous comparons ces traitements avec le cas où le TX-100 n'a pas été ajouté (Figure III-4), le contenu en [^3H]Chol a augmenté dans les fractions 5-10 et diminué dans les fractions 1-4. Ceci est une signature d'une solubilisation partielle des membranes des vésicules (Waarts et al., 2002). De plus, nous pouvons observer que le contenu en [^3H]Chol total mesuré dans les TIFFs formées à partir de vésicules « pro-rafts » (PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol) – c'est-à-dire à partir de bicouches présentant une coexistence de phase l_o/l_d (de Almeida et al., 2003) – est plus élevé que celui des TIFFs issues de vésicules lipidiques à deux composants (PC/SM 2:1 mol/mol). La solubilisation membranaire totale survient lorsque aucun signal de Chol radiomarqué - ou très peu – n'est détecté dans les quatre premières fractions (exemple dans la figure III-4, données \diamond). Les fractions (1-3), (4), et (1-4) sont nommées respectivement fractions de basse densité, de moyenne densité, et de basse + moyenne densité. Les fractions (5-10) sont les fractions de haute densité.

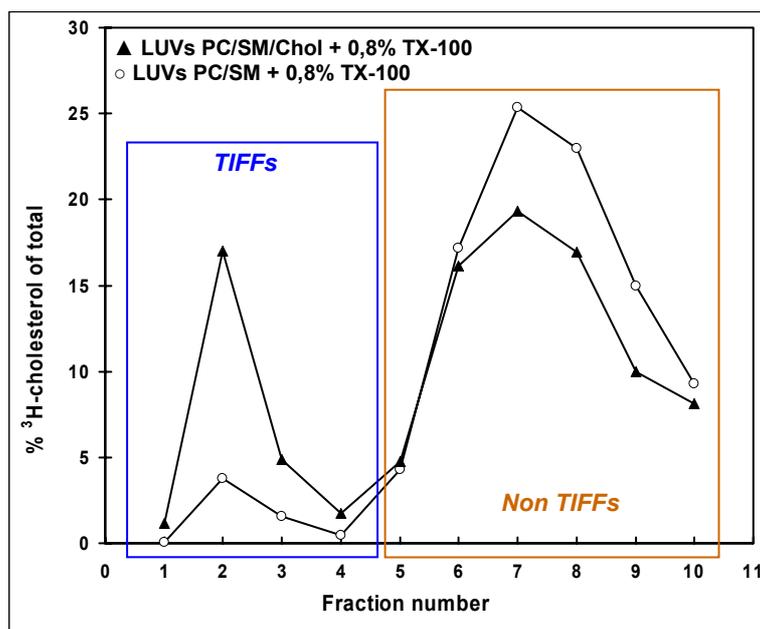


Figure III-5. Effet du traitement par 0.8% TX-100 (w/v) sur deux types de liposomes de composition : PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol, et PC/SM 2:1 mol/mol. Les fractions de basse et moyenne densité (1-4) renferment les membranes insolubles au détergent (TIFFs) ; les fractions de haute densité (5-10) renferment les membranes solubilisées (sous forme de micelles mixtes détergent-lipides).

III.4 Dépendance des TIFFs vis-à-vis de la concentration en Triton X-100

Afin d'analyser plus en détails la résistance des membranes à la solubilisation par les détergents, nous avons suivi la même procédure d'isolement des fractions sur gradient de densité, mais en utilisant des quantités variables de TX-100. Les expériences ont été réalisées sur des vésicules lipidiques à deux composants, et sur des membranes hétérogènes de composition propre à former des domaines, lesquelles subissent un processus de solubilisation plus compliqué (Keller et al., 2005).

III.4.1 Membranes lipidiques à deux composants

Pour les vésicules PC/SM 2:1 mol/mol, nous avons étudié l'effet du TX-100 pour une gamme de concentrations de 0 à 0.8% (w/v). La concentration en lipides a été fixée à 300 μ M.

La figure III-6.A présente le contenu en $[^3\text{H}]\text{Chol}$ en pourcentage total pour chacune des fractions du gradient de densité de sucrose pour différentes quantités de TX-100 utilisées.

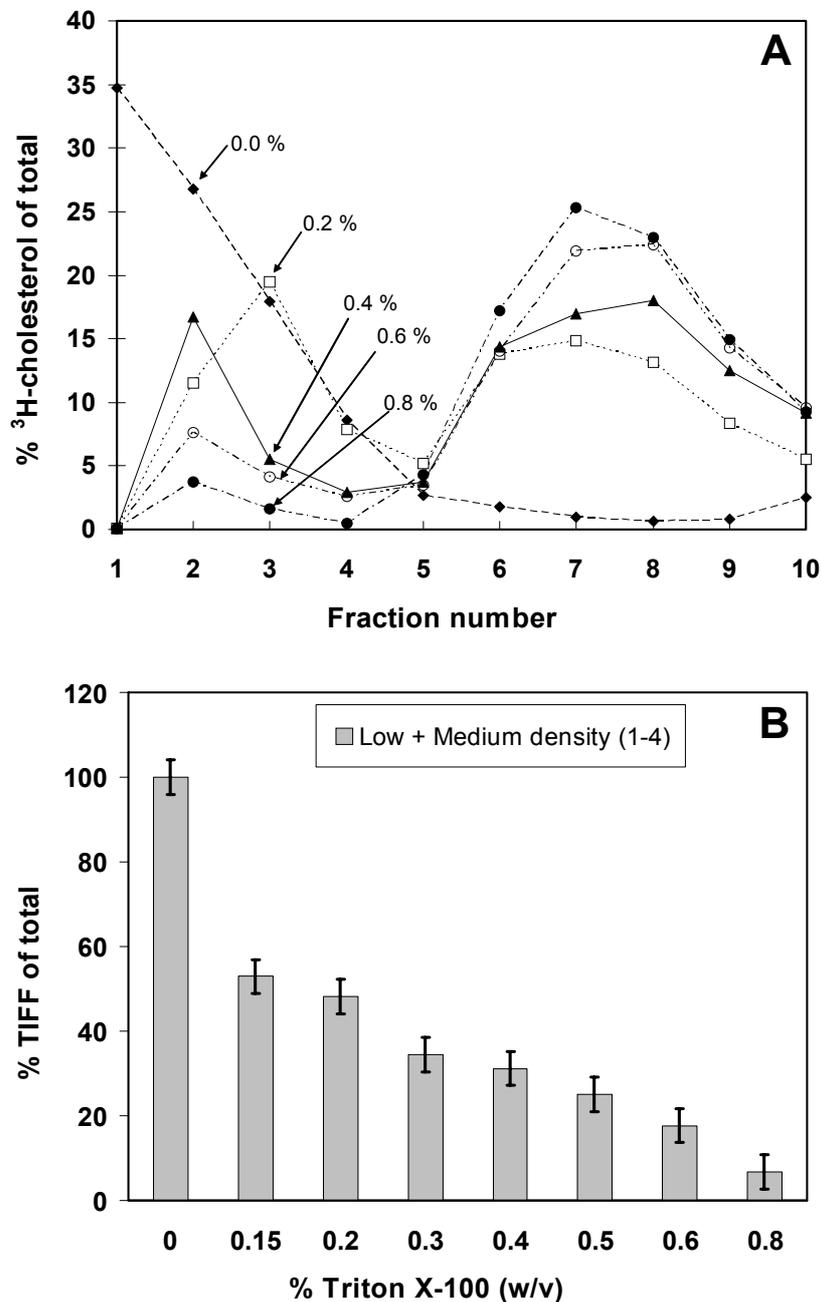


Figure III-6. Analyse par fractionnement après gradient de densité de sucrose des membranes résultant du traitement de LUVs PC/SM 2:1 mol/mol (300 μM de lipides) par du TX-100 à 4°C. (A) Pourcentage de $[^3\text{H}]\text{Chol}$ total pour chaque fraction: (◆) 0 % TX-100 (w/v); (□) 0.2 % TX-100 (w/v); (▲) 0.4 % TX-100 (w/v); (○) 0.6 % TX-100 (w/v); (●) 0.8 % TX-100 (w/v). (B) Pourcentage de TIFFs total dans les fractions (1-4) (Basse densité + moyenne densité, barres grises) du gradient de densité de sucrose après traitement des LUVs (PC/SM 2:1 mol/mol) avec du TX-100 à 4°C. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre deux expériences.

En comparaison avec le cas dans lequel le TX-100 n'a pas été ajouté (Figure III-6.A, données \blacklozenge), nous pouvons remarquer que les structures flottantes initiales sont en partie solubilisées et que les TIFFs sont composées maintenant principalement de structures de densité correspondante à la fraction (2) (Figure III-6.A, données \square , \blacktriangle , \circ , et \bullet). La solubilisation partielle des structures initiales flottantes indique que, à partir de 0.2% de TX-100 (w/v), le rapport effectif de saturation détergent/lipides est dépassé. Aussi, ces structures doivent correspondre à des vésicules plus petites que les vésicules initiales dont les membranes sont saturées en détergent. La figure III-6.B résume les résultats obtenus (pourcentage total du contenu en TIFFs) pour les différents pourcentages utilisés de TX-100. L'augmentation progressive de la quantité de Triton appliquée mène peu à peu à la disparition des TIFFs. Pour une concentration de 0.8% (w/v) TX-100, la quantité de fractions flottantes est faible, ce qui nous permet d'estimer la solubilisation totale de la membrane autour de 0.9% TX-100 (w/v).

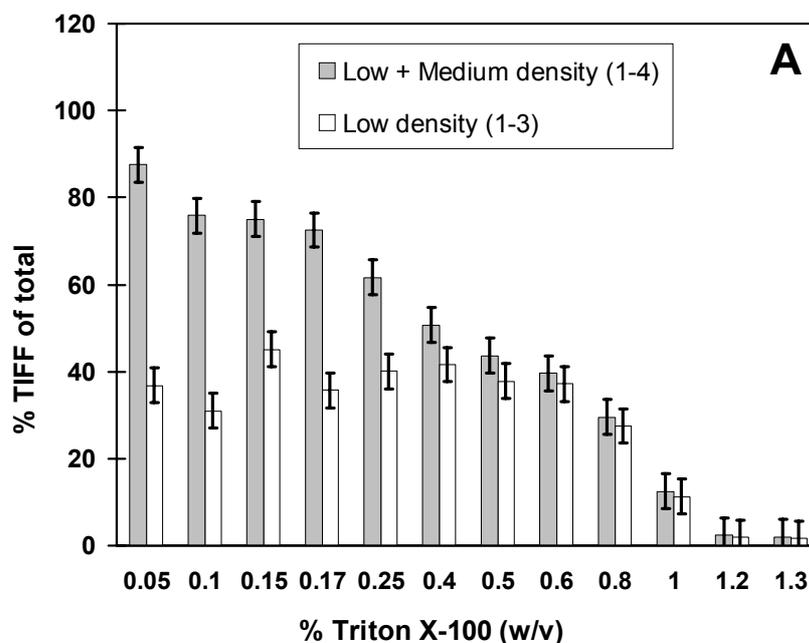
Dans le cas de vésicules en phase l_o pure (SM/Chol 1:1 mol/mol), nous n'avons observé aucune solubilisation jusqu'à 2.5% TX-100 (w/v), pourcentage pour lequel plus de 90% du contenu en [^3H]Chol total a été trouvé dans les fractions flottantes insolubles au TX-100.

III.4.2 LUVs hétérogènes (coexistence de phase l_o/l_d)

Nous avons utilisé des vésicules de composition PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) dont les membranes présentent une coexistence de phase l_o/l_d (de Almeida et al., 2003; Puff et al., 2005; Staneva et al., 2005). La gamme de concentration en TX-100 utilisée était de 0-1.3% (w/v) pour une concentration en lipides fixée à 300 μM . La figure III-7.A expose les résultats obtenus avec les différents pourcentages de Triton utilisés. De la même façon que pour les membranes à deux composants (PC/SM 2:1 mol/mol) (Figure III-6), nous constatons que la quantité de TIFFs (fractions 1-4) diminue quand le rapport détergent/lipides augmente (Figure III-7.A, barres grises). La membrane lipidique est d'abord partiellement solubilisée – indiquant qu'au minimum le rapport effectif de saturation détergent/lipides de la phase l_d est atteint – et ensuite totalement micellisée à 1.2% TX-100 (w/v). La solubilisation totale des membranes indique qu'à 1.2% TX-100 (w/v), le rapport effectif de saturation détergent/lipides de la phase l_o est également atteint. Ainsi, le processus de solubilisation des bicouches lipidiques hétérogènes apparaît semblable à celui des bicouches à deux

composants, mais avec un déplacement vers des pourcentages de TX-100 utilisés plus élevés. Ceci est cohérent avec l'observation habituellement décrite dans la littérature selon laquelle la résistance aux détergents de la phase l_0 est plus importante (Sot et al., 2002).

Cependant, d'importantes différences entre les processus de solubilisation apparaissent si une analyse précise des fractions flottantes est réalisée. L'addition de petites quantités de TX-100 jusqu'à 0.25% (w/v) sur des LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) déplace les structures lipidiques résultant du traitement vers des fractions de plus hautes densités (autour de 1.076 kg/m^3 , fraction 4) (Figure III-7.B). En effet pour des traitements par 0.1-0.25% TX-100 (w/v), le [^3H]Chol est principalement retrouvé dans la quatrième fraction, correspondante à des structures de moyenne densité, qui n'existaient pas après traitement des vésicules à deux composants (PC/SM 2:1 mol/mol). Lorsque la quantité de TX-100 utilisé augmente encore (0.4-0.6% TX-100 w/v), une translation du maximum vers la fraction (2) – c'est-à-dire vers les structures de basse densité – est observée. Nous supposons que ce phénomène résulte de l'incorporation croissante du détergent dans les domaines de la membrane en phase l_0 , indiquant que le rapport effectif détergent/lipides demeure encore en dessous du rapport effectif de saturation de la phase l_0 . Les résultats décrits précédemment sont reportés dans la figure III-7.A (barres blanches).



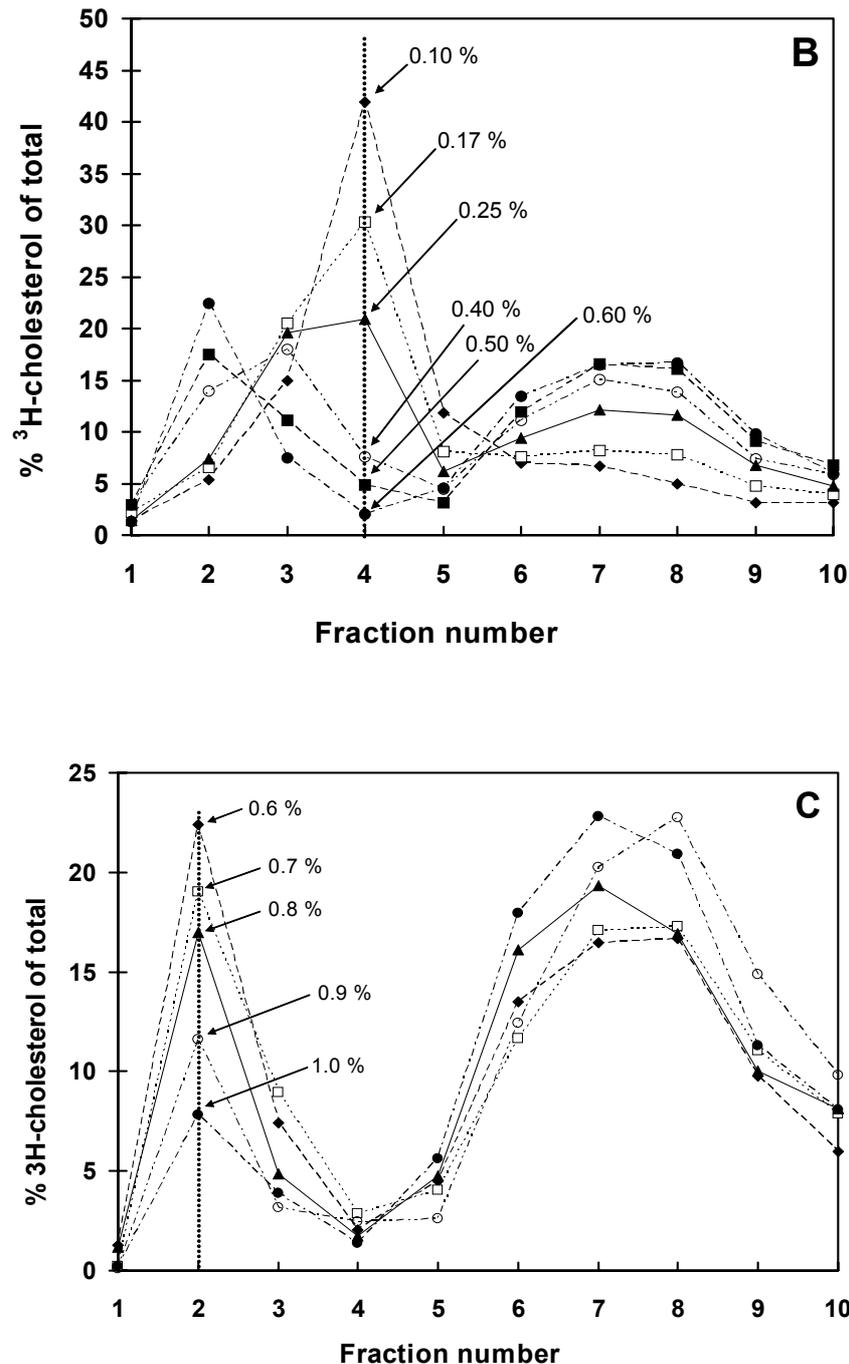


Figure III-7. Analyse par fractionnement après gradient de densité de sucrose des membranes résultant du traitement de LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol (300 μ M de lipides) par du Triton X-100 à 4°C. (A) Pourcentage de TIFFs total dans les fractions 1 à 4 (Basse densité + moyenne densité, barres grises) et 1 à 3 (Basse densité) du gradient de densité de sucrose. (B) Pourcentage de [^3H]Chol total pour chaque fraction: (◆) 0.1 % TX-100 (w/v); (□) 0.17 % TX-100 (w/v); (▲) 0.25 % Triton X-100 (w/v); (○) 0.4 % TX-100 (w/v); (■) 0.5 % TX-100 (w/v); (●) 0.6 % TX-100 (w/v). (C) Pourcentage de [^3H]Chol total pour chaque fraction: (◆) 0.6 % TX-100 (w/v); (□) 0.7 % TX-100 (w/v); (▲) 0.8 % TX-100 (w/v); (○) 0.9 % TX-100 (w/v); (●) 1.0 % TX-100 (w/v).

Pour des quantités de détergent dans une gamme comprise entre 0.05 et 0.6% (w/v), le contenu en $[^3\text{H}]\text{Chol}$ des fractions (1-3) reste relativement constant, alors qu'on observe une diminution progressive du contenu en $[^3\text{H}]\text{Chol}$ dans la fraction (4) (représentée par la différence entre les barres grises et blanches dans la figure III-7.A) correspondant au signal des structures de densité moyenne. Au-dessus de 0.6% TX-100 (w/v), les contenus en $[^3\text{H}]\text{Chol}$ des fractions (1-3) et (1-4) sont presque identiques – indiquant que la fraction (4) n'apporte plus de contribution pour le contenu en $[^3\text{H}]\text{Chol}$ dans les fractions (1-4) – et décroissent jusqu'à leur annulation (Figure III-7.A). Nous pouvons remarquer que cette diminution se fait sans autre changement dans la densité des structures (Figure III-7.C) puisque le contenu majeur en $[^3\text{H}]\text{Chol}$ est récupéré dans la fraction (2), ce qui indique qu'une solubilisation progressive des structures flottantes existantes à 0.6% TX-100 (w/v) a lieu. Le rapport effectif de saturation détergent/lipides de la phase l_0 est maintenant atteint.

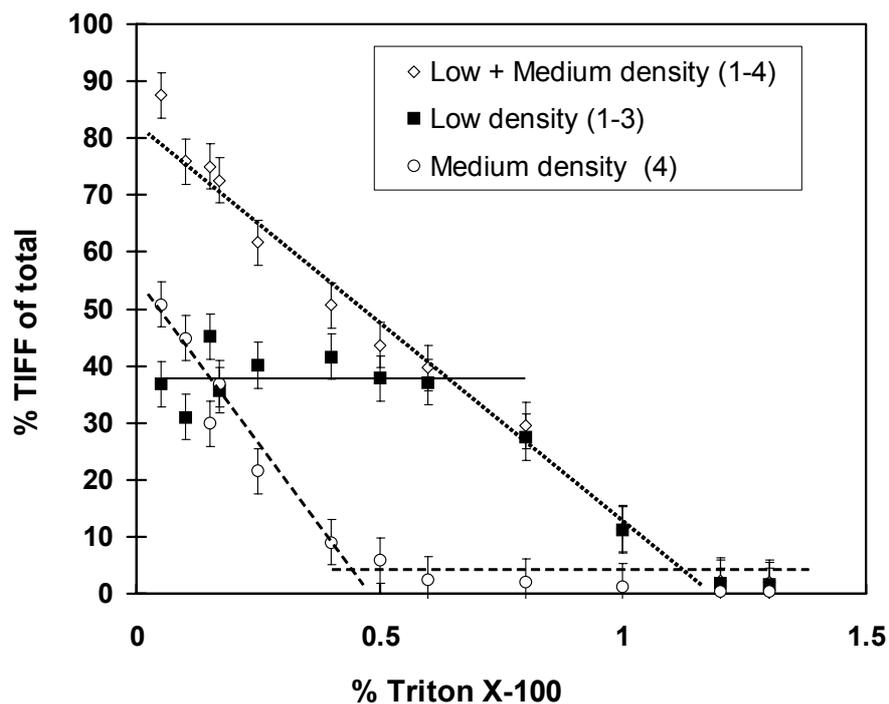


Figure III-8. Pourcentage de TIFF total dans les fractions 1 à 4 (\diamond), 1 à 3 (\blacksquare) et 4 (\circ) du gradient de densité de sucrose après traitement des LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) avec du TX-100 à 4°C. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre deux expériences.

L'ensemble des résultats est résumé dans la figure III-8. Cette figure nous permet de faire valoir qu'il est possible de trouver une concentration particulière en détergent (autour de

0.6% TX-100 w/v, pour 300 μ M de lipides et une extraction par le détergent à 4°C) pour laquelle seuls les domaines membranaires en phase l_o présents au niveau de vésicules PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) sont récupérés en tant que TIFFs. Toutefois ces domaines presque saturés en détergent TX-100, ne sont évidemment pas exactement les mêmes que ceux existant avant le traitement par le détergent.

III.5 Discussion

L'isolement de fractions membranaires résistantes aux détergents à partir d'une membrane dépend d'un certain nombre de paramètres incluant la nature du détergent, la température, l'état physique de la bicouche lipidique (Schuck et al., 2003; Staneva et al., 2005). Mais si on considère un détergent spécifique, tous ces paramètres peuvent être réduits en une variable clé contrôlant le degré de solubilisation : il s'agit du rapport effectif détergent/lipides. En effet, celui-ci dépend fortement de l'état physique de la bicouche lipidique qui découle elle-même de la composition lipidique et de la température (Heerklotz, 2002; Schnitzer et al., 2003; Sot et al., 2002).

Nos résultats montrent qu'en fonction du rapport détergent/lipides, il est possible d'obtenir une solubilisation partielle ou complète des membranes lipidiques. Des fractions flottantes insolubles résultant du traitement par détergent ont pu être obtenues quel que soit l'état physique de la membrane étudiée ici (Figures III-6.B et III-7.A). Cependant, notre objectif est d'isoler les fractions flottantes ayant pour origine les structures membranaires ordonnées préexistantes, c'est-à-dire les domaines en phase l_o des LUVs. Le point clé est donc de déterminer le rapport détergent/lipides approprié permettant cela. L'existence d'un tel rapport est actuellement l'objet de débats car de récents résultats montrent que le TX-100 pourrait promouvoir, ou même induire, la formation de domaines membranaires en phase l_o (Heerklotz et al., 2003; Keller et al., 2005; Subczynski and Kusumi, 2003). Cette idée est basée sur l'hypothèse selon laquelle les domaines ordonnés et désordonnés d'une membrane sont en équilibre et que par conséquent, la modification des domaines en phase l_d pendant l'incorporation du TX-100 va nécessairement altérer les domaines en phase l_o . Toutefois, des travaux récents de notre équipe (Staneva et al., 2005) ont montré que l'addition de TX-100 sur des vésicules géantes (GUVs) présentant une coexistence de phase l_o/l_d induisait le

bourgeonnement des domaines l_0 suivi de la formation de vésicules séparées. Ainsi quelle que soit la structure des objets déconnectés issus de « l'attaque » des LUVs par le Triton (vésicules ou bicelles), la déconnection physique des deux phases est susceptible d'empêcher toute modification importante de la composition du domaine en phase l_0 et de ce fait pourrait autoriser l'existence d'un tel rapport.

Lors du processus de solubilisation des LUVs dans lesquelles coexistent les phases l_0 et l_d , deux mécanismes auraient lieu simultanément. En dessous de 0.6% TX-100 (w/v), la fraction membranaire en phase l_d est solubilisée progressivement (nous nous situons au-dessus du rapport effectif saturant détergent/lipides pour la phase l_d), pendant que la fraction membranaire en phase l_0 se charge en détergent (nous nous situons au-dessous du rapport effectif saturant de la phase l_0). Ceci est cohérent avec l'augmentation du contenu en [^3H]Chol des fractions non flottantes solubilisées (5-10) (Figure III-7.B) et avec le déplacement du maximum de densité des fractions flottantes vers les plus basses densités (1-4) (Figure III-7.B). Autour de 0.6% TX-100 (w/v), la phase l_d est solubilisée totalement et le rapport effectif saturant détergent/lipides pour la phase l_0 est alors atteint : on n'observe plus de translation des pics de densité des fractions flottantes (Figure III-7.C). Enfin, au-dessus de 0.6% Triton X-100 (w/v), la diminution du contenu en [^3H]Chol des fractions flottantes insolubles (Figure III-7.C) avec l'augmentation de la quantité de TX-100 utilisé indique une solubilisation progressive des structures flottantes existantes. Par conséquent, nous considérons qu'un rapport détergent/lipides situé autour de 0.6% TX-100 (w/v) pour 300 μM de lipides, est approprié pour isoler dans les fractions flottantes insolubles, les structures membranaires préexistantes, c'est-à-dire les domaines l_0 chargés en TX-100.

Les représentations des figures III-9.A et B permettent de corroborer cette explication. Dans la figure III-9.A, le pourcentage de TIFFs total dans les fractions (1-3) est tracé en fonction d'un rapport particulier détergent/lipides $R_{\text{TX/Lip}}$. Il doit être mentionné ici que la quantité de lipides présents dans la phase l_0 n'est pas considérée dans le but de calculer les valeurs de ce ratio particulier $R_{\text{TX/Lip}}$ pour la phase l_d . Pour les LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol), tous les lipides sont pris en compte. Pour les LUVs hétérogènes, nous savons que la fraction de surface membranaire occupée par les domaines en phase l_0 est d'environ 20% d'après les études d'auto-extinction de fluorescence du C12NBD-PC (Coste et al., 2006). Ainsi 80% de la quantité de lipides totaux est considéré pour le calcul de ce rapport particulier détergent/lipides (lipides présents en phase l_d). Nous observons ici que la quantité de détergent nécessaire solubilisant complètement les LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol) correspond

approximativement à la quantité de détergent nécessaire pour commencer la solubilisation des fractions flottantes (1-3) des LUVs présentant une coexistence de phase l_o/l_d . Cette transition se produit autour de 0.6% Triton X-100 (w/v), ce qui est cohérent avec nos conclusions.

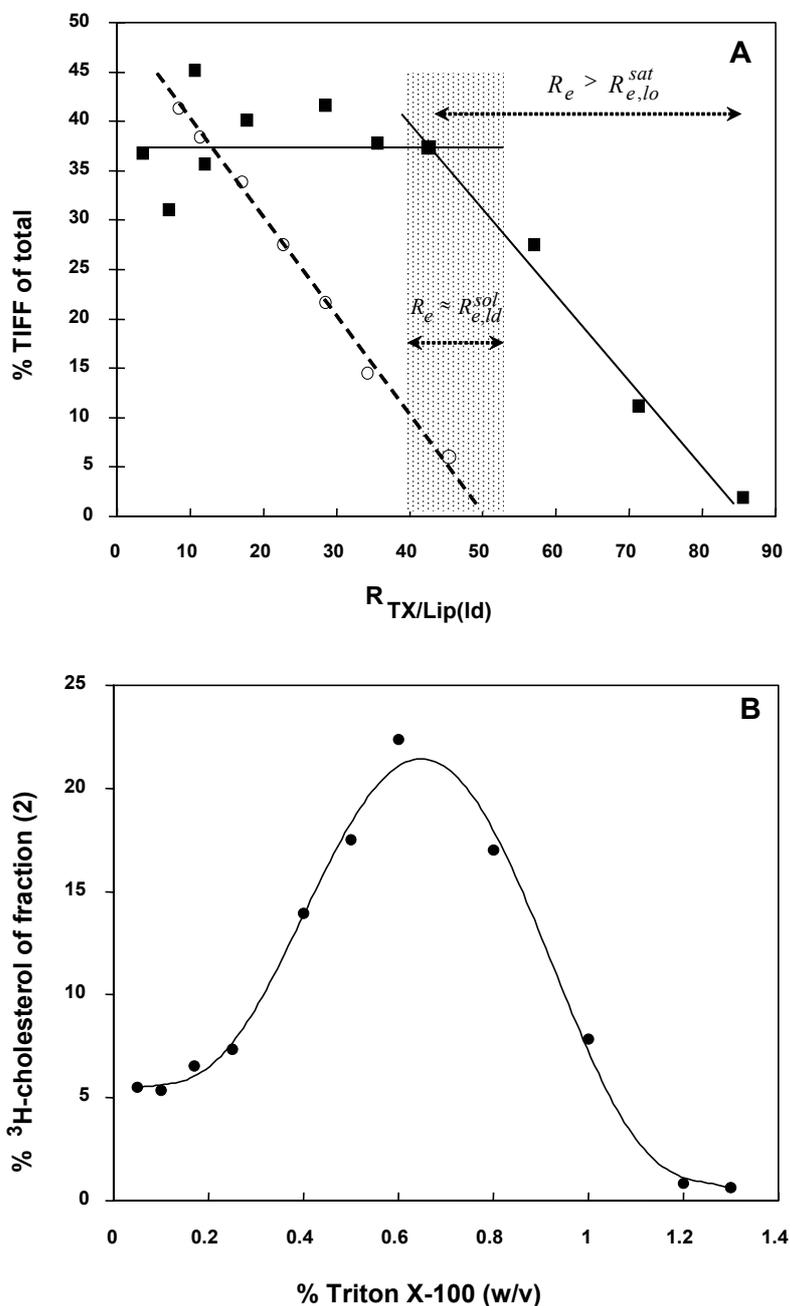


Figure III-9. (A) Pourcentage de TIFFs total dans les fractions (1-3) en fonction d'un rapport particulier détergent/lipides $R_{TX/Lip}$. $R_{TX/Lip}$ est calculé en considérant seulement les lipides qui ne sont pas dans la phase l_o (100% pour les LUVs PC/SM 2:1 mol/mol et 80% pour les LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol). (■) LUVs PC/SM/Chol (53:27:20 mol/mol). (○) LUVs PC/SM (2:1) mol/mol. (B) Pourcentage du contenu en 3H Chol de la fraction (2) en fonction du pourcentage en TX-100 (w/v) pour les LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol.

De plus, dans la figure III-9.B, la valeur maximale de [^3H]Chol de la fraction (2) est également atteinte pour 0.6% Triton X-100 (w/v). Des expériences supplémentaires nous permettront de déterminer plus précisément ce maximum. Nous pensons que le rapport effectif détergent/lipides correspondant au maximum d'une telle courbe doit être le rapport approprié permettant d'obtenir les TIFFs représentant le mieux les domaines en phase l_0 existant dans la membrane des LUVs avant l'addition de détergent.

Nous avons présenté ici un scénario idéal qui nous autorise à déterminer le rapport détergent sur lipides approprié permettant l'isolement des domaines en phase l_0 d'une vésicule hétérogène. Ce scénario ne prend pas en compte les différents facteurs cinétiques compétitifs entre la déconnection physique et la rééquilibration de phase possible des domaines en phase l_0 sous l'effet d'interactions avec le TX-100.

IV. Discussion générale et perspectives

La membrane plasmique des cellules eucaryotes, comme tout autre membrane biologique, renferme plus d'espèces lipidiques qu'il n'est nécessaire pour former une bicouche simple (Bretscher, 1973). Ceci a contribué à l'intérêt grandissant pour la question de la finalité d'une telle diversité. La notion selon laquelle des lipides spécifiques pourraient contribuer à l'organisation des membranes en des domaines discrets de propriétés différentes n'a reçu qu'une légère attention pendant de nombreuses années (Jain and White, 1977) (Thompson and Tillack, 1985). La mise en évidence d'associations particulières entre des lipides et des protéines destinées à un adressage apical dans les cellules épithéliales polarisées a conduit à la définition du concept de radeaux lipidiques qui a engendré des controverses vives dans le domaine de la membranologie (Simons and Ikonen, 1997; Simons and van Meer, 1988). Le concept d'assemblages de sphingolipides et cholestérol fonctionnant comme des plates-formes pour des protéines membranaires a été appuyé par l'observation de leur résistance à la solubilisation par des détergents (Brown and Rose, 1992). Cette avancée dans la vision fonctionnelle de la membrane a entraîné la publication d'un grand nombre d'articles dans lesquels la capacité à résister à l'extraction par des détergents à 4°C a été considérée comme le moyen d'identifier les radeaux et d'isoler des protéines associées. De cette façon, l'implication des radeaux lipidiques a été montrée pour un nombre important d'évènements biologiques comme la transduction signalétique, l'endocytose, l'infection par des pathogènes, etc. A cause de leurs différences d'origine et de signification conceptuelle, cette relation directe entre des radeaux biologiques définis fonctionnellement et des fractions de membranes isolées biochimiquement sur la base de leur résistance à des détergents, a suscité de nombreuses questions, dont la principale est : les radeaux lipidiques existent-ils réellement dans les membranes ou sont-ils des artefacts dus aux détergents ? Même si des études sur des membranes cellulaires par FRET ou SPT par exemple, tendent à démontrer leur existence *in-vivo*, il n'y a pas eu de mise en évidence sans équivoque, et donc ces questions demeurent encore aujourd'hui l'objet de débats (Lichtenberg et al., 2005). Les membranes modèles constituent en ce sens un outil simple et efficace pour aider à la caractérisation des domaines membranaires et à la compréhension des mécanismes de solubilisation des membranes lipidiques par les détergents. Elles ont contribué à la vision actuelle de la structure de la

membrane grâce à l'observation faite dans des bicouches lipidiques contenant des niveaux élevés de cholestérol d'une coexistence de deux phases liquides : la phase liquide désordonnée et la phase liquide ordonnée. À cause de leur concentration élevée en cholestérol, les radeaux membranaires ont été considérés comme étant des domaines dont les lipides se trouvent en phase l_o . La formation des radeaux reposerait sur les interactions lipides-lipides, et également sur la capacité de certaines protéines à s'entourer de lipides spécifiques, induisant leur ségrégation et favorisant ainsi l'apparition d'une nouvelle phase.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la problématique des radeaux membranaires en utilisant des membranes modèles LUV et GUV. Nous avons d'abord cherché à caractériser la formation de domaines en phase l_o au niveau d'un système constitué de vésicules de type LUV, de composition ternaire susceptible de créer une coexistence de phase. Pour cela, nous avons établi une méthodologie permettant d'abord de mettre en évidence la coexistence de phase l_o/l_d dans notre système, puis de faire une estimation quantitative de la surface (la fraction membranaire) occupée par les domaines en phase l_o , pour différentes températures et différents rapports molaires entre les trois composants lipidiques. Des études sur la possibilité d'une séparation de phase sur des vésicules de petite taille ont déjà été menées. Certaines ont été effectuées en tirant profit du principe d'auto-extinction de fluorescence sur des vésicules de type MLVs, liposomes constitués de plusieurs bicouches concentriques et de taille hétérogène (typiquement de quelques μm) (Ahmed et al., 1997; Xu et al., 2001). D'autres ont utilisé la méthode de FRET sur des LUVs de 100 nm (de Almeida et al., 2005; Loura et al., 2001). Cependant pour ces deux types d'études, deux molécules marqueurs pouvant se distribuer de façon différente entre les phases lipidiques ont été utilisées. Aussi l'utilisation dans notre système d'une seule molécule fluorescente capable d'auto-extinction, pour sonder la coexistence de phase nous a paru être une approche plus facilement interprétable. La question de l'existence de phases lipidiques différentes sur des vésicules de petit rayon de courbure paraît pertinente, notamment dans un contexte biologique (les vésicules de sécrétion ou les endosomes rencontrés dans la cellule sont en effet des objets mesurant quelques dizaines voire une centaine de nanomètres). Il semble donc d'après les résultats obtenus que la séparation de phase soit bien un phénomène possible sur des LUVs de 100 nm. D'un point de vue plus physico-chimique, il serait maintenant intéressant d'évaluer jusqu'à quelle valeur de rayon de courbure cette séparation et coexistence de phase peut survenir.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la possibilité d'extraire fidèlement les domaines en phase l_0 , c'est-à-dire les domaines présents avant l'action du détergent et strictement en phase l_0 . Les nombreuses polémiques liées à la corrélation « DRM = phase l_0 » ont motivé notre étude. Historiquement, il n'y a aucun doute sur le fait que la découverte de Brown et Rose (Brown and Rose, 1992), démontrant qu'une protéine à ancre GPI associée à des lipides particuliers devenait résistante à la solubilisation à 4°C dans l'appareil de Golgi pendant son transport à la surface apicale, a constitué une percée importante dans la discipline. Les fractions membranaires résistantes aux détergents flottaient à de basses densités et étaient enrichies en sphingolipides et cholestérol. Les travaux consécutifs de Brown et London (Brown and London, 2000; London and Brown, 2000) ont attribué la propriété de résistance aux détergents aux domaines liquides ordonnés, alors que les bicouches liquides désordonnées étaient solubilisées par le Triton X-100 dans les mêmes conditions. La solubilisation des protéines des radeaux après ce traitement est devenu ainsi un outil standard pour spécifier l'implication d'une protéine dans un processus lié aux radeaux. L'utilité de cette méthodologie a été attestée par le fait que la plupart des protéines présentant une importante fraction dans les DRMs sont également associées aux radeaux dans la membrane native lorsque d'autres méthodes (imagerie par exemple) sont employées. Cependant, il est important de rappeler que le nombre de protéines décrites comme associées aux radeaux, et analysées attentivement par d'autres méthodes est encore faible. De plus, toutes les protéines localisées dans les radeaux cellulaires *in-vivo* ne sont pas forcément retrouvées dans les DRMs, à l'exemple de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (Harder et al., 1998). Par ailleurs, les DRMs les plus communément étudiés sont ceux issus du Triton X-100. D'autres détergents ont été utilisés, et ont révélé une grande variabilité dans leur contenu en lipides et en protéines pour une même membrane (Schuck et al., 2003), ce qui pourrait être considéré comme une preuve solide appuyant l'idée que les DRMs diffèrent des radeaux. L'interprétation alternative – les membranes natives contiennent différents types de radeaux qui sont spécifiquement isolés par des détergents spécifiques – n'est pas cohérente avec l'hypothèse de base selon laquelle les radeaux sont formés d'une séparation spontanée de deux phases liquides dans la bicouche lipidique. Les résultats d'expériences utilisant des détergents sur les systèmes cellulaires doivent donc être regardés et interprétés avec attention. Par ailleurs, des études sur les membranes modèles ont bien été effectuées et ont contribué à la compréhension du mécanisme de solubilisation par les détergents. Mais des études systématiques plus approfondies du point de vue physico-chimique des systèmes lipides,

détergent, eau dans les systèmes cellulaires et modèles manquent, et seraient très bénéfiques pour la méthodologie. L'intention de l'étude originale de Yu et collaborateurs (Yu et al., 1973) de permettre une présélection de certaines protéines par la solubilisation de membranes dans du Triton à froid était simple, et a tout à fait rempli son objectif. Les études suivantes basées sur l'extraction à froid des membranes par du Triton X-100 ont suivi un protocole similaire (Brown and Rose, 1992; Skibbens et al., 1989), et ont donné lieu à la vague d'agitation autour des radeaux que nous connaissons, sans qu'une réelle remise en question de la méthodologie ne soit faite. L'isolement d'une fraction membranaire par l'action d'un détergent dépend en effet d'un grand nombre de paramètres comme la nature du détergent, la température, l'état physique de la bicouche lipidique, le pH, la force ionique du milieu environnant, paramètres qui peuvent être réduits en une seule variable contrôlant le degré de solubilisation : le rapport effectif détergent/lipides pour un système donné. Il semble donc évident que l'application de protocoles d'extraction très similaires lors de l'utilisation de différents détergents, sur des membranes de nature différente et à des températures variables va mener à des résultats différents. La possibilité de déterminer un rapport détergent/lipides, propre à isoler strictement les domaines en phase l_o , que nous avons tenté ici de mettre en évidence, tend à démontrer que les détergents pourraient être utiles dans l'isolement des domaines à partir des membranes modèles. Ceci pourrait être réalisé à condition que la quantité de détergent appliquée soit ajustée en fonction de la quantité de lipides en présence. L'existence d'un tel rapport pourrait même réconcilier les partisans et les détracteurs de l'utilisation des détergents pour la caractérisation de la structure des membranes.

Une question fondamentale doit retenir notre attention : comment corréler des expériences réalisées à 4°C avec la présence de domaines radeaux membranaires à température physiologique donc 37°C ? Les expériences de solubilisation à 4°C sont basées sur l'hypothèse selon laquelle les DRMs récupérées à 4°C sont les « radeaux » qui existent dans la membrane à 37°C en absence de détergent. Pourtant, à 4°C l'état des phases membranaires est très différent de celui à 37°C, avec à 4°C une prédominance de l'ordre dans la structure membranaire (phase gel, phase liquide ordonnée) pour un grand nombre de membranes lipidiques. Les domaines en présence à 4°C ne sont donc pas représentatifs des domaines existant à 37°C. Pour tenter de récupérer des domaines présents à 37°C, il paraît donc évident que la température à laquelle doit se faire l'extraction est 37°C. Par ailleurs, le processus de solubilisation d'une membrane par un détergent diffère en fonction de la

température. La dépendance vis-à-vis de la température de la solubilisation est complexe, mais globalement la solubilisation de bicouches à l'état liquide cristallin nécessite plus de quantité de détergent lorsque la température augmente (R_e^{sol} augmente avec la température) pour une même phase. Ceci a été observé notamment pour des vésicules de DPPC (Schnitzer et al., 2003), et de composition hétérogène (PC, SM et Chol) (Sot et al., 2002), et peut s'expliquer par le fait que l'augmentation de la température rend la courbure spontanée des molécules plus négative à cause du désordre engendré dans les chaînes hydrophobes, et le volume plus important occupé par celles-ci. Cette courbure spontanée plus négative va s'opposer au transfert dans des micelles mixtes courbées positivement. Concernant les sphingolipides, par eux-mêmes, ils ne contribuent pas à l'insolubilité aux détergents. Ceci s'explique aisément sur la base de la théorie de « la forme moléculaire » d'Israelachvili (Israelachvili et al., 1980). Les glycosphingolipides, en particulier les gangliosides, ont une forme conique, favorisant la formation de micelles en coopération avec le Triton X-100. Dans les cas des membranes de composition hétérogène, les interactions sphingomyéline-cholestérol ont pour effet d'augmenter la résistance à l'extraction, elles sont donc déterminantes dans la capacité à résister à la solubilisation en particulier à 37°C (Sot et al., 2002). En fait, le transfert de sphingomyéline dans des micelles nécessiterait la rupture de liaisons hydrogènes, ce qui apparaît comme un processus défavorable. Les mécanismes d'action du Triton X-100 à 4°C et 37°C sont donc différents, mais l'existence de la phase l_o à 37°C dans les membranes modèles et la stabilité de la phase l_o grâce aux interactions sphingolipides-cholestérol vis-à-vis de l'extraction par le Triton X-100 (de Almeida et al., 2003) doivent rendre possible l'isolement des domaines à 37°C.

Ici, en faisant une étude à 4°C sur des membranes modèles, nous n'avons pas cherché à reproduire un phénomène qui aurait lieu à 37°C dans les cellules, notre système ne nous le permettant pas. Dans notre système modèle, il paraissait plus évident de commencer l'étude par des extractions à 4°C. De cette façon, les conditions classiquement décrites pour la solubilisation des membranes cellulaires étaient approchées, le rapport détergent/lipides plus facilement atteint (puisque davantage de détergent est requis pour la solubilisation à plus hautes températures), et les phases ordonnées plus stables, moins dynamiques qu'à 37°C. La même méthodologie doit pouvoir être appliquée pour obtenir le rapport isolant les phases l_o à 37°C sur les membranes modèles. S'agissant de radeaux au sein des membranes biologiques, la situation est plus complexe. En effet, une multitude d'autres espèces moléculaires entrent en jeu (protéines, glycolipides...) participant pour certaines à la formation et à la stabilisation

des radeaux. La taille, la dynamique des radeaux sont également variables selon qu'ils sont stabilisés ou non. Tous ces paramètres vont donc intervenir dans le mécanisme de solubilisation par le détergent. Cependant, si on considère les domaines membranaires sous l'angle de la coexistence de phases liquides au sein des membranes cellulaires - celle-ci ayant été démontrée (Meder et al., 2006) - on peut supposer que le principe d'extraction d'une phase l_o sur des membranes modèles puisse également s'appliquer à des systèmes cellulaires. Il faudrait pour cela contrôler le mieux possible des paramètres tels que la quantité de lipides, et de protéines en présence, l'état de croissance, de stimulation de la cellule, etc.

Un autre point important doit être abordé, celui de la thèse énonçant les conséquences artefactuelles de l'utilisation du Triton X-100 sur les membranes (Heerklotz, 2002). Le principal argument qui s'oppose à l'isolement strict des structures membranaires en phase l_o par des détergents, repose sur le fait que pendant l'action du Triton sur les membranes hétérogènes, des interactions non idéales entre sphingomyéline et Triton X-100 perturberait l'équilibre des phases et favoriserait la formation de domaines l_o , induisant donc un biais important dans une expérience visant justement à extraire ce type de domaine. En fait, dans notre étude nous justifions la possibilité d'isoler fidèlement les domaines en phase l_o par le Triton X-100 grâce à la déconnexion physique entre les phases l_d et l_o , qui doit se produire lors de l'interaction du détergent avec la bicouche lipidique. Ceci s'appuie sur des expériences précédentes réalisées sur GUVs (Staneva et al., 2005) qui ont montrées que l'application du détergent sur la membrane avait pour conséquence le bourgeonnement et la « vésiculation » des domaines en phase l_o . Nous pensons donc que la séparation physique des deux phases est susceptible d'empêcher tout mélange et perturbation de l'équilibre de phase, ce qui autorise l'existence d'un rapport détergent/lipides permettant d'extraire les domaines l_o . Cependant, du fait des différences de taille et donc de courbure entre les systèmes LUV et GUV, nous pouvons légitimement nous demander si les phénomènes induits par l'action du Triton dans les deux types de membrane sont comparables. La récupération de fractions résistantes au détergent après centrifugation implique que les fragments ou domaines insolubles doivent avoir une taille minimale et une structure particulière pour être recueillis et considérés comme DRMs, ce dont nous pourrions douter lorsque des LUVs sont utilisées. Lors des expériences sur les membranes de composition hétérogènes, des DRMs ont bien été obtenues après traitement par Triton X-100 et séparation par gradient de densité. Si des vésicules de domaines l_o n'ont pu bourgeonner à partir de la membrane de LUV à cause de la courbure

trop importante, la forme sous laquelle les domaines l_0 ont été isolés correspond peut-être à des micelles discoïdes (bicelles), un type d'assemblage lipidique de faible densité dans tous les cas, qu'il serait intéressant d'examiner. Dans notre modèle, il n'est cependant pas improbable que la distribution du détergent au sein de la membrane change légèrement l'équilibre des phases avant la déconnexion physique, mais cela ne doit pas affecter grandement la taille des domaines l_0 .

Par ailleurs pour certains auteurs (Lichtenberg et al., 2005), les DRMs ne sont que le résultat d'une solubilisation incomplète des membranes par les détergents, donc d'une expérience dans laquelle l'équilibre n'aurait pas été atteint. Ceci mériterait des recherches plus approfondies pour être vérifié. En effet, nous avons effectué un traitement par du Triton 0.75% (w/v) de membranes hétérogènes composées de PC/SM/Chol suivant la proportion 53:27:20 mol%, avec des durées d'incubation différentes : 5, 15, 30 et 120 minutes. De façon intéressante, les profils de solubilisation obtenus ensuite se sont montrés identiques, ce qui tendrait à prouver que la solubilisation des membranes modèles atteint son équilibre dans notre échelle de temps d'incubation, et qu'elle s'effectue relativement rapidement dans notre système.

En conclusion, par ces expériences et résultats, nous n'avons pas l'intention d'apporter la clé de la résolution du problème de la pertinence des DRMs et de la phase l_0 dans le contexte des radeaux lipidiques. Mais ce que nous avons cherché à faire, c'est participer au débat et tenter de réenvisager les études sur les domaines en phase l_0 , particulièrement les données issues de la solubilisation des membranes qui tendent à montrer l'utilité des détergents pour ce genre d'études.

Références bibliographiques

- Ahmed, S.N., Brown, D.A. and London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*, **36**, 10944-10953.
- Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. and Kinoshita, K., Jr. (1998) Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. *Biophys J*, **74**, 2973-2982.
- Almeida, P.F., Vaz, W.L. and Thompson, T.E. (1993) Percolation and diffusion in three-component lipid bilayers: effect of cholesterol on an equimolar mixture of two phosphatidylcholines. *Biophys J*, **64**, 399-412.
- Aloia, R.C., Jensen, F.C., Curtain, C.C., Mobley, P.W. and Gordon, L.M. (1988) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 900-904.
- Anderson, R.G. and Jacobson, K. (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, **296**, 1821-1825.
- Angelova, M. and Dimitrov, D. (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **81**, 303-311.
- Angelova, M.I. and Tsoneva, I. (1999) Interactions of DNA with giant liposomes. *Chem Phys Lipids*, **101**, 123-137.
- Bangham, A. (1983) *Liposome letters*. Academic Press.
- Barenholz, Y. (1984) Physiology of membrane fluidity. In Shinitzky, M. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. 1, pp. 131-174.
- Baumann, N.A., Sullivan, D.P., Ohvo-Rekila, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., Beh, C.T. and Menon, A.K. (2005) Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry*, **44**, 5816-5826.
- Binder, W.H., Barragan, V. and Menger, F.M. (2003) Domains and rafts in lipid membranes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 5802-5827.
- Boggs, J.M. (1987) Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim Biophys Acta*, **906**, 353-404.
- Brennan, J.D., Brown, R.S., McClintock, C.P. and Krull, U.J. (1990) Fluorescence transduction of an enzyme-substrate reaction by modulation of lipid membrane structure. *Analytica Chimica Acta*, **237**, 253-263.
- Bretscher, M.S. (1973) Membrane structure: some general principles. *Science*, **181**, 622-629.
- Brown, D.A. and London, E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol*, **164**, 103-114.

Références bibliographiques

- Brown, D.A. and London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, **275**, 17221-17224.
- Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, **68**, 533-544.
- Brown, R.S., Brennan, J.D. and Krull, U.J. (1994) Self-quenching of nitrobenzoxadiazole labelled phospholipids in lipid membranes. *J. Chem. Phys.*, **100**, 6019-6027.
- Burger, K.N. (2000) Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic*, **1**, 605-613.
- Calhoun, W.I. and Shipley, G.G. (1979) Fatty acid composition and thermal behavior of natural sphingomyelins. *Biochim Biophys Acta*, **555**, 436-441.
- Campana, V., Sarnataro, D. and Zurzolo, C. (2005) The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol*, **15**, 102-111.
- Chatterjee, S. and Mayor, S. (2001) The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1969-1987.
- Chattopadhyay, A. (1990) Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes. *Chem Phys Lipids*, **53**, 1-15.
- Chattopadhyay, A. and London, E. (1988) Spectroscopic and ionization properties of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids in model membranes. *Biochim Biophys Acta*, **938**, 24-34.
- Conwell, C.C. and Huang, L. (2005) Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv Genet*, **53**, 3-18.
- Coste, V., Puff, N., Lockau, D., Quinn, P.J. and Angelova, M.I. (2006) Raft-like domain formation in large unilamellar vesicles probed by the fluorescent phospholipid analogue, C12NBD-PC. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 460-467.
- Cribier, S., Morrot, G., Neumann, J.M. and Devaux, P.F. (1990) Lateral diffusion of erythrocyte phospholipids in model membranes comparison between inner and outer leaflet components. *Eur Biophys J*, **18**, 33-41.
- Cullis, P.R. and de Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, **559**, 399-420.
- Danielli, J. and Davson, H. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Comp Physiol*, **5**, 495-508.
- Danielsen, E.M. and Hansen, G.H. (2003) Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions. *Biochim Biophys Acta*, **1617**, 1-9.
- de Almeida, R.F., Fedorov, A. and Prieto, M. (2003) Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys J*, **85**, 2406-2416.
- de Almeida, R.F., Loura, L.M., Fedorov, A. and Prieto, M. (2005) Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol*, **346**, 1109-1120.
- Devaux, P.F. and Morris, R. (2004) Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, **5**, 241-246.

Références bibliographiques

- Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K. and Gratton, E. (2001a) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J*, **80**, 1417-1428.
- Dietrich, C., Volovyk, Z.N., Levi, M., Thompson, N.L. and Jacobson, K. (2001b) Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10642-10647.
- Dietrich, C., Yang, B., Fujiwara, T., Kusumi, A. and Jacobson, K. (2002) Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J*, **82**, 274-284.
- Ebrahim, S., Peyman, G.A. and Lee, P.J. (2005) Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*, **50**, 167-182.
- Edidin, M. (2003a) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 414-418.
- Edidin, M. (2003b) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **32**, 257-283.
- El Hage Chahine, M., Cribier, S. and Devaux, P.F. (1993) Phospholipid transmembrane domains and lateral diffusion in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 447-451.
- Falguieres, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., Salamero, J. and Johannes, L. (2001) Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell*, **12**, 2453-2468.
- Feigenson, G.W. and Buboltz, J.T. (2001) Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophys J*, **80**, 2775-2788.
- Field, K.A., Holowka, D. and Baird, B. (1995) Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9201-9205.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F. and Giacca, M. (2003) Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem*, **278**, 34141-34149.
- Foster, L.J., De Hoog, C.L. and Mann, M. (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5813-5818.
- Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A. (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol*, **157**, 1071-1081.
- Gardam, M. and Silvius, J.R. (1989) Intermixing of dipalmitoylphosphatidylcholine with phospho- and sphingolipids bearing highly asymmetric hydrocarbon chains. *Biochim Biophys Acta*, **980**, 319-325.
- Giocondi, M.C., Vie, V., Lesniewska, E., Goudonnet, J.P. and Le Grimellec, C. (2000) In situ imaging of detergent-resistant membranes by atomic force microscopy. *J Struct Biol*, **131**, 38-43.
- Glaser, M. (1993) Lipid domains in biological membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 475-481.

Références bibliographiques

- Hansen, G.H., Immerdal, L., Thorsen, E., Niels-Christiansen, L.L., Nystrom, B.T., Demant, E.J. and Danielsen, E.M. (2001) Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J Biol Chem*, **276**, 32338-32344.
- Hao, M., Mukherjee, S. and Maxfield, F.R. (2001) Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13072-13077.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. and Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*, **141**, 929-942.
- Harder, T. and Simons, K. (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 534-542.
- Heerklotz, H. (2002) Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J*, **83**, 2693-2701.
- Heerklotz, H., Szadkowska, H., Anderson, T. and Seelig, J. (2003) The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton. *J Mol Biol*, **329**, 793-799.
- Helenius, A. and Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*, **415**, 29-79.
- Helms, J.B. and Zurzolo, C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, **5**, 247-254.
- Hertz, R. and Barenholz, Y. (1977) The relations between the composition of liposomes and their interaction with Triton X-100. *J Colloid Interface Sci*, **60**, 188-200.
- Hoekstra, D. (1982) Fluorescence method for measuring the kinetics of Ca²⁺-induced phase separations in phosphatidylserine-containing lipid vesicles. *Biochemistry*, **21**, 1055-1061.
- Holopainen, J.M., Brockman, H.L., Brown, R.E. and Kinnunen, P.K. (2001) Interfacial interactions of ceramide with dimyristoylphosphatidylcholine: impact of the N-acyl chain. *Biophys J*, **80**, 765-775.
- Horejsi, V. (2003) The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev*, **191**, 148-164.
- Huster, D., Muller, P., Arnold, K. and Herrmann, A. (2001) Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine. *Biophys J*, **80**, 822-831.
- Ikonen, E. (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 470-477.
- Ipsen, J.H., Karlstrom, G., Mouritsen, O.G., Wennerstrom, H. and Zuckermann, M.J. (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta*, **905**, 162-172.
- Israelachvili, J.N., Marcelja, S. and Horn, R.G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys*, **13**, 121-200.
- Jain, M.K. and White, H.B., 3rd. (1977) Long-range order in biomembranes. *Adv Lipid Res*, **15**, 1-60.
- Julien, M., Tournier, J.F. and Tocanne, J.F. (1993) Differences in the transbilayer and lateral motions of fluorescent analogs of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the apical plasma membrane of bovine aortic endothelial cells. *Exp. Cell. Res.*, **208**, 387-397.

Références bibliographiques

- Kahya, N., Brown, D.A. and Schwille, P. (2005) Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry*, **44**, 7479-7489.
- Kawasaki, K., Yin, J.J., Subczynski, W.K., Hyde, J.S. and Kusumi, A. (2001) Pulse EPR detection of lipid exchange between protein-rich raft and bulk domains in the membrane: methodology development and its application to studies of influenza viral membrane. *Biophys J*, **80**, 738-748.
- Keller, S., Tsamaloukas, A. and Heerklotz, H. (2005) A quantitative model describing the selective solubilization of membrane domains. *J Am Chem Soc*, **127**, 11469-11476.
- Kenworthy, A.K., Petranova, N. and Edidin, M. (2000) High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell*, **11**, 1645-1655.
- Knoll, W., Schmidt, G., Rotzer, H., Henkel, T., Pfeiffer, W., Sackmann, E., Mittler-Neher, S. and Spinke, J. (1991) Lateral order in binary lipid alloys and its coupling to membrane functions. *Chem Phys Lipids*, **57**, 363-374.
- Koynova, R. and Caffrey, M. (1995) Phases and phase transitions of the sphingolipids. *Biochim Biophys Acta*, **1255**, 213-236.
- Kurzchalia, T.V. and Parton, R.G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 424-431.
- Kusumi, A., Koyama-Honda, I. and Suzuki, K. (2004) Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic*, **5**, 213-230.
- Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J. and Fujiwara, T. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **34**, 351-378.
- Kusumi, A. and Suzuki, K. (2005) Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 234-251.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A. and Dautry-Varsat, A. (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*, **7**, 661-671.
- Lange, Y. and Steck, T.L. (1996) The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostasis. *Trends Cell Biol*, **6**, 205-208.
- Lange, Y., Swaisgood, M.H., Ramos, B.V. and Steck, T.L. (1989) Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, **264**, 3786-3793.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M. and Steck, T.L. (1999) Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res*, **40**, 2264-2270.
- Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim Biophys Acta*, **821**, 470-478.

Références bibliographiques

- Lichtenberg, D., Goni, F.M. and Heerklotz, H. (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci*, **30**, 430-436.
- Lichtenberg, D., Opatowski, E. and Kozlov, M.M. (2000) Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, **1508**, 1-19.
- Lichtenberg, D., Robson, R.J. and Dennis, E.A. (1983) Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim Biophys Acta*, **737**, 285-304.
- Lin, S. and Struve, W.S. (1991) Time-resolved fluorescence of nitrobenzoxadiazole-aminohexanoic acid: effect of intermolecular hydrogen-bonding on non-radiative decay. *Photochem Photobiol*, **54**, 361-365.
- Lipardi, C., Nitsch, L. and Zurzolo, C. (2000) Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting. *Mol Biol Cell*, **11**, 531-542.
- Lipowsky, R. and Sackmann, E. (1995) *Structure and Dynamics of Membranes, Handbook of Biological Physics*. Elsevier, North Holland.
- Lisanti, M.P. and Rodriguez-Boulan, E. (1990) Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends Biochem Sci*, **15**, 113-118.
- Liscum, L. and Underwood, K.W. (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem*, **270**, 15443-15446.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000) *Molecular cell biology*. W.H. Freeman.
- London, E. (2002) Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 480-486.
- London, E. and Brown, D.A. (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta*, **1508**, 182-195.
- Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P.A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F.S., Sommer, B. and Yankner, B.A. (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, **3**, 460-464.
- Loura, L.M., Fedorov, A. and Prieto, M. (2001) Fluid-fluid membrane microheterogeneity: a fluorescence resonance energy transfer study. *Biophys J*, **80**, 776-788.
- MacDonald, R.C., MacDonald, R.I., Menco, B.P., Takeshita, K., Subbarao, N.K. and Hu, L.R. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*, **1061**, 297-303.
- Mason, J.T. (1988) Mixing behavior of symmetric chain length and mixed chain length phosphatidylcholines in two-component multilamellar bilayers: evidence for gel and liquid-crystalline phase immiscibility. *Biochemistry*, **27**, 4421-4429.
- Maxfield, F.R. (2002) Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 483-487.

Références bibliographiques

- Mazeres, S., Schram, V., Tocanne, J.F. and Lopez, A. (1996) 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl-labeled phospholipids in lipid membranes: differences in fluorescence behavior. *Biophys J*, **71**, 327-335.
- McCabe, J.B. and Berthiaume, L.G. (2001) N-terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae. *Mol Biol Cell*, **12**, 3601-3617.
- McIntosh, T.J., Vidal, A. and Simon, S.A. (2003) Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. *Biophys J*, **85**, 1656-1666.
- McMullen, T.P.W., Lewis, R.N.A.H. and McElhaney, R.N. (2004) Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **8**, 459-468.
- Meder, D., Moreno, M.J., Verkade, P., Vaz, W.L. and Simons, K. (2006) Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 329-334.
- Menger, F.M. and Angelova, M.I. (1998) Giant vesicles: Imitating the cytological processes of cell membranes. *Acc Chem Res*, **31**, 789-797.
- Mesquita, R.M., Melo, E., Thompson, T.E. and Vaz, W.L. (2000) Partitioning of amphiphiles between coexisting ordered and disordered phases in two-phase lipid bilayer membranes. *Biophys J*, **78**, 3019-3025.
- Milhiet, P.E., Domec, C., Giocondi, M.C., Van Mau, N., Heitz, F. and Le Grimmeléc, C. (2001) Domain formation in models of the renal brush border membrane outer leaflet. *Biophys J*, **81**, 547-555.
- Morris, R., Cox, H., Mombelli, E. and Quinn, P.J. (2004) *Membrane dynamics and domains*. Klüwer Academic Plenum Publishers, London.
- Morrot, G., Cribier, S., Devaux, P.F., Geldwerth, D., Davoust, J., Bureau, J.F., Fellmann, P., Hervé, P. and Frilley, B. (1986) Asymmetric lateral mobility of phospholipids in the erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6863-6867.
- Moscho, A., Orwar, O., Chiu, D.T., Modi, B.P. and Zare, R.N. (1996) Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11443-11447.
- Mouritsen, O.G. (1991) Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem Phys Lipids*, **57**, 179-194.
- Munro, S. (1995) An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *Embo J*, **14**, 4695-4704.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
- Murase, K., Fujiwara, T., Umemura, Y., Suzuki, K., Iino, R., Yamashita, H., Saito, M., Murakoshi, H., Ritchie, K. and Kusumi, A. (2004) Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys J*, **86**, 4075-4093.
- Nichols, B.J. (2003) GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Curr Biol*, **13**, 686-690.

Références bibliographiques

- Nomenclature, C.o.B. (1978) International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry Commission on Biochemical Nomenclature. The nomenclature of lipids. *J Lipid Res*, **19**, 114-129.
- Nomura, F., Inaba, T., Ishikawa, S., Nagata, M., Takahashi, S., Hotani, H. and Takiguchi, K. (2004) Microscopic observations reveal that fusogenic peptides induce liposome shrinkage prior to membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3420-3425.
- Nyholm, T. and Slotte, J.P. (2001) Comparison of Triton X-100 penetration into phosphatidylcholine and sphingomyelin mono- and bilayers. *Langmuir*, **17**, 4724-4730.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P. and Slotte, J.P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*, **41**, 66-97.
- Ono, A. and Freed, E.O. (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13925-13930.
- Palade, G.E. (1953) The fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.*, **24**.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L. and Zurzolo, C. (2004) Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol*, **167**, 699-709.
- Parton, R.G. and Richards, A.A. (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, **4**, 724-738.
- Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*, **3**, 311-320.
- Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, **378**, 281-292.
- Pike, L.J. (2006) Rafts defined. *The Keystone Symposium on Lipid rafts and cell function*, Steamboat Springs, Colorado.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K. and Horber, J.K. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol*, **148**, 997-1008.
- Puff, N., Lamaziere, A., Seigneuret, M., Trugnan, G. and Angelova, M.I. (2005) HDLs induce raft domain vanishing in heterogeneous giant vesicles. *Chem Phys Lipids*, **133**, 195-202.
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H. and Heller, H.C. (2003) *Life: the science of biology*. Sinauer.
- Racker, E. (1972) Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and a purified Ca⁺⁺ - adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **247**, 8198-8200.
- Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C.A., Plattner, H. and Illges, H. (2003) Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8241-8246.
- Rajendran, L. and Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*, **118**, 1099-1102.
- Ramstedt, B. and Slotte, J.P. (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett*, **531**, 33-37.
- Rietveld, A. and Simons, K. (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 467-479.

Références bibliographiques

- Rigaud, J.L. (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz J Med Biol Res*, **35**, 753-766.
- Roper, K., Corbeil, D. and Huttner, W.B. (2000) Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol*, **2**, 582-592.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, **68**, 673-682.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G. and Mayor, S. (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell*, **2**, 411-423.
- Samsonov, A.V., Mihalyov, I. and Cohen, F.S. (2001) Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J*, **81**, 1486-1500.
- Sanchez, S.A., Bagatolli, L.A., Gratton, E. and Hazlett, T.L. (2002) A two-photon view of an enzyme at work: *Crotalus atrox* venom PLA2 interaction with single-lipid and mixed-lipid giant unilamellar vesicles. *Biophys J*, **82**, 2232-2243.
- Sankaram, M.B. and Thompson, T.E. (1990) Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*, **29**, 10670-10675.
- Sankaram, M.B. and Thompson, T.E. (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8686-8690.
- Scheiffele, P., Roth, M.G. and Simons, K. (1997) Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo J*, **16**, 5501-5508.
- Schnitzer, E., Kozlov, M.M. and Lichtenberg, D. (2005) The effect of cholesterol on the solubilization of phosphatidylcholine bilayers by the non-ionic surfactant Triton X-100. *Chem Phys Lipids*, **135**, 69-82.
- Schnitzer, E., Lichtenberg, D. and Kozlov, M.M. (2003) Temperature-dependence of the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) by the non-ionic surfactant Triton X-100, kinetic and structural aspects. *Chem Phys Lipids*, **126**, 55-76.
- Schnitzer, J.E., McIntosh, D.P., Dvorak, A.M., Liu, J. and Oh, P. (1995) Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science*, **269**, 1435-1439.
- Schroeder, F., Frolov, A.A., Murphy, E.J., Atshaves, B.P., Jefferson, J.R., Pu, L., Wood, W.G., Foxworth, W.B. and Kier, A.B. (1996) Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking. *Proc Soc Exp Biol Med*, **213**, 150-177.
- Schroeder, F., Nemezc, G., Wood, W.G., Joiner, C., Morrot, G., Ayrault-Jarrier, M. and Devaux, P.F. (1991) Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta*, **1066**, 183-192.
- Schroeder, R., London, E. and Brown, B.A. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12130-12134.

Références bibliographiques

- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A. and Simons, K. (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5795-5800.
- Schutz, G.J., Kada, G., Pastushenko, V.P. and Schindler, H. (2000) Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *Embo J*, **19**, 892-901.
- Seigneuret, M., Zachowski, A., Hermann, A. and Devaux, P.F. (1984) Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochemistry*, **23**, 4271-4275.
- Sharma, P., Sabharanjak, S. and Mayor, S. (2002) Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis. *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 205-214.
- Sheets, E.D., Lee, G.M., Simson, R. and Jacobson, K. (1997) Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry*, **36**, 12449-12458.
- Silvius, J.R. (1986) Solid- and liquid-phase equilibria in phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine mixtures. A calorimetric study. *Biochim Biophys Acta*, **857**, 217-228.
- Silvius, J.R. (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta*, **1610**, 174-183.
- Silvius, J.R., del Giudice, D. and Lafleur, M. (1996) Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length. *Biochemistry*, **35**, 15198-15208.
- Silvius, J.R., Read, B.D. and McElhaney, R.N. (1979) Thermotropic phase transitions of phosphatidylcholines with odd-numbered n-acyl chains. *Biochim Biophys Acta*, **555**, 175-178.
- Simons, K. and Gruenberg, J. (2000) Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol*, **10**, 459-462.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons, K. and Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science*, **290**, 1721-1726.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Simons, K. and van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197-6202.
- Simons, K. and Vaz, W.L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269-295.
- Simson, R., Sheets, E.D. and Jacobson, K. (1995) Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys J*, **69**, 989-993.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Skibbens, J.E., Roth, M.G. and Matlin, K.S. (1989) Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J Cell Biol*, **108**, 821-832.

- Slimane, T.A., Trugnan, G., Van, I.S.C. and Hoekstra, D. (2003) Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell*, **14**, 611-624.
- Smaby, J.M., Brockman, H.L. and Brown, R.E. (1994) Cholesterol's interfacial interactions with sphingomyelins and phosphatidylcholines: hydrocarbon chain structure determines the magnitude of condensation. *Biochemistry*, **33**, 9135-9142.
- Smaby, J.M., Momsen, M., Kulkarni, V.S. and Brown, R.E. (1996) Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry*, **35**, 5696-5704.
- Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T. and Lisanti, M.P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, **19**, 7289-7304.
- Solon, J., Gareil, O., Bassereau, P. and Gaudin, Y. (2005) Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *J Gen Virol*, **86**, 3357-3363.
- Sot, J., Collado, M.I., Arrondo, J.L.R., Alonso, A. and Goñi, F.M. (2002) Triton X-100-resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon. *Langmuir*, **18**, 2828 - 2835.
- Staneva, G., Angelova, M.I. and Koumanov, K. (2004) Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem Phys Lipids*, **129**, 53-62.
- Staneva, G., Seigneuret, M., Koumanov, K., Trugnan, G. and Angelova, M.I. (2005) Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles: a direct microscopy observation. *Chem Phys Lipids*, **136**, 55-66.
- Stoddart, A., Dykstra, M.L., Brown, B.K., Song, W., Pierce, S.K. and Brodsky, F.M. (2002) Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity*, **17**, 451-462.
- Subczynski, W.K. and Kusumi, A. (2003) Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim Biophys Acta*, **1610**, 231-243.
- Suzuki, K., Sanematsu, F., Fujiwara, T., Edidin, M. and Kusumi, A. (2001) Rapid continual formation/dispersion of raft-like domains in the resting cell membrane. *Mol Biol Cell*, **12**, 470a.
- Takeda, M., Leser, G.P., Russell, C.J. and Lamb, R.A. (2003) Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14610-14617.
- Talbott, C.M., Vorobyov, I., Borchman, D., Taylor, K.G., DuPre, D.B. and Yappert, M.C. (2000) Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, **1467**, 326-337.
- Thompson, T.E. and Tillack, T.W. (1985) Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **14**, 361-386.

Références bibliographiques

- Thorn, H., Stenkula, K.G., Karlsson, M., Ortegren, U., Nystrom, F.H., Gustavsson, J. and Stralfors, P. (2003) Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell*, **14**, 3967-3976.
- van Meer, G. (1998) Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol*, **8**, 29-33.
- van Meer, G. (2005) Cellular lipidomics. *Embo J*, **24**, 3159-3165.
- van Meer, G. and Simons, K. (1988) Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem*, **36**, 51-58.
- Vaz, W.L. and Almeida, P. (1993) Phase topology and percolation in multi-phase lipid bilayers: is the biological membrane a domain mosaic? *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 482-488.
- Veatch, S.L. and Keller, S.L. (2002) Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Phys Rev Lett*, **89**, 268101.
- Veatch, S.L. and Keller, S.L. (2005) Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 172-185.
- Vist, M.R. and Davis, J.H. (1990) Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, **29**, 451-464.
- Waarts, B.L., Bittman, R. and Wilschut, J. (2002) Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion. Lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes. *J Biol Chem*, **277**, 38141-38147.
- Wang, T.Y., Leventis, R. and Silvius, J.R. (2001) Partitioning of lipidated peptide sequences into liquid-ordered lipid domains in model and biological membranes. *Biochemistry*, **40**, 13031-13040.
- Wang, T.Y. and Silvius, J.R. (2003) Sphingolipid partitioning into ordered domains in cholesterol-free and cholesterol-containing lipid bilayers. *Biophys J*, **84**, 367-378.
- White, D.A. (1973) *The phospholipid composition of mammalian tissues*. G Ansell, J Hawthorne, R Dawson, New York.
- Worthman, L.A., Nag, K., Davis, P.J. and Keough, K.M. (1997) Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy. *Biophys J*, **72**, 2569-2580.
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. and London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J Biol Chem*, **276**, 33540-33546.
- Yamada, E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*, **1**, 445-458.
- Yeagle, P.L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, **822**, 267-287.
- Yu, J., Fischman, D.A. and Steck, T.L. (1973) Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct*, **1**, 233-248.

Liste des figures

- Figure I-1.** (a) Vue schématique d'une cellule eucaryote. Elle possède une organisation interne très complexe : le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries constituent les principales sous-unités de la cellule. (b) Cellule du thymus vue au microscope électronique à transmission (x 10 000). D'après (<http://biogeol.free.fr/Cours+/cell03.htm>)..... 14
- Figure I-2.** Représentation schématique d'une membrane biologique. La membrane est constituée d'un double feuillet lipidique associé à des protéines. 15
- Figure I-3.** A) Formule détaillée de la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), et le phosphatidylinositol (PI). B) (a) Structure et formule chimique d'un phospholipide : la phosphatidylcholine, à gauche : modèle compact, au centre : formule chimique. (b) Représentation symbolique des phospholipides. (c) Modèle de l'orientation des phospholipides dans la membrane. Données adaptées de (Purves et al., 2003). 16
- Figure I-4.** Molécules de sphingolipides. A) Les sphingolipides sont des dérivés de la sphingosine. Ils varient selon la fonction greffée au niveau de l'hydroxyle en position 1 de la sphingosine. B) Les glycosphingolipides correspondent à la substitution en position 1 de mono- ou oligosaccharides. (a) Exemple d'un cérébroside : le galactocérébroside. (b) Exemple d'un ganglioside : le GM1 (ganglioside monosialide 1). (c) Structure de l'acide sialique ou acide N-acétylneuraminique ou NANA, faisant partie du GM1. Gal = galactose; Glc = glucose, GalNAc = N-acétylgalactosamine. D'après Molecular Biology of the Cell, third edition..... 18
- Figure I-5.** (a) Formule chimique du Chol. (b) Représentation schématique de l'insertion du Chol au niveau des membranes. La molécule de Chol s'oriente de la même manière que les phospholipides : sa partie hydrophile au contact des têtes polaires des phospholipides, et sa partie hydrophobe dans le cœur hydrophobe de la bicouche. D'après : (<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/cholesterol.jpg>). 19
- Figure I-6.** Comparaison des structures chimiques des trois composants majeurs des membranes cellulaires. Un glycérophospholipide : la PC, un sphingolipide : la SM et le Chol. Les chaînes carbonées apparaissent en noir. Adapté de : www.avantilipids.com..... 20
- Figure I-7.** Schéma représentant la dynamique des membranes biologiques : le modèle de la mosaïque fluide..... 23
- Figure I-8.** Les lipides dans la bicouche lipidique sont animés de mouvements : la diffusion latérale, rotationnelle et l'échange transversal (ou « flip-flop »). Adapté de : (Lipowsky and Sackmann, 1995). 25
- Figure I-9.** Modèle représentant l'hétérogénéité des membranes biologiques. Les différentes espèces lipidiques sont représentées par des couleurs différentes. D'après (Edidin, 2003a). 26
- Figure I-10.** Mécanisme de formation du "lipid shell". Le Chol (en violet) et les sphingolipides (en rouge) s'auto-assemblent pour former des complexes enrichis en Chol. Le modèle propose que chaque protéine interagit de façon dynamique avec au moins deux complexes (flèches bleues), devenant ainsi entourée d'une « carapace de lipides ». D'après (Anderson and Jacobson, 2002)..... 29

- Figure I-11.** Modèle d'organisation des radeaux lipidiques et cavéoles dans la membrane plasmique. Les radeaux (en rouge) ségrégent à partir des autres régions (en bleu) de la bicouche. (a) Des protéines sont localisées dans les radeaux. Elles y sont rattachées grâce à des ancres GPI, des chaînes acylées (exemple ici de la protéine Yes de la famille des kinases Src), ou grâce à un domaine transmembranaire spécifique (protéine hémagglutinine HA du virus de la grippe). (b) La bicouche lipidique au niveau des radeaux est asymétrique avec un enrichissement en SM et glycosphingolipides (en rouge) dans le feuillet exoplasmique, et un enrichissement en glycérophospholipides (en vert) dans le feuillet cytoplasmique. Le Chol (en gris) est présent dans les deux feuillets. (c) Les cavéoles sont formées par l'auto-assemblage des molécules de cavéoline. La localisation des cavéoles au niveau des radeaux lipidiques est le résultat d'interactions avec le Chol, et l'acylation des cavéolines en C-terminal. D'après (Simons and Ikonen, 1997)..... 31
- Figure I-12.** Schéma général montrant les différents niveaux possibles d'implication des radeaux lipidiques dans les mécanismes cellulaires. Ils interviennent notamment dans les processus d'internalisation par endocytose, dépendante ou non des cavéoles ; dans les mécanismes d'adressage dans les cellules polarisées ; dans les phénomènes de transduction du signal au niveau des récepteurs immunologiques ; dans les étapes de l'infection par des pathogènes. D'après (Rajendran and Simons, 2005)..... 37
- Figure I-13.** Molécules de détergents et de phospholipides. En raison de leur géométrie, la plupart des phospholipides ont spontanément tendance à former des bicouches planes. On peut les qualifier de « courbophobes », par opposition à la plupart des molécules de détergents, dont la géométrie leur impose d'agrèger en des micelles sphériques, et qui peuvent être décrits comme « courbophiles ». Les détergents et les phospholipides, respectivement dans les systèmes bicouches et micelles, y subissent une contrainte stérique. D'après (Lichtenberg et al., 2005). 41
- Figure I-14.** Modèle à trois étapes de solubilisation d'une membrane homogène. Lorsque le rapport effectif détergents/lipides R_e^{sat} est atteint, la membrane est saturée en détergent. Entre R_e^{sat} et R_e^{sol} , une coexistence de micelles mixtes détergents-lipides et de bicouches lipidiques saturées en détergent apparaît dans le système. Au-delà de R_e^{sol} , la membrane est totalement solubilisée..... 42
- Figure I-15.** Modèle de compartimentalisation de la membrane plasmique. De petits compartiments, dans lesquels protéines et lipides subissent une diffusion lente, s'étendent sur toute la surface membranaire. Le passage des molécules d'un compartiment à l'autre s'accomplirait toutes les 25 ms environ. D'après (Kusumi and Suzuki, 2005). 49
- Figure I-16.** Structure d'une vésicule unilamellaire. D'après (Menger and Angelova, 1998). 50
- Figure I-17.** Différentes formes possibles des lipides membranaires et les structures d'auto-assemblage qui leur correspondent. Adapté de (Burger, 2000)..... 53
- Figure I-18.** Les deux principales séparations de phase rencontrées au sein d'une bicouche lipidique de composition binaire : a) séparation de phase latérale, b) séparation de phase verticale. D'après (Binder et al., 2003)..... 54
- Figure I-19.** Divers effets externes menant à la séparation de phase latérale dans une membrane composée de deux lipides. D'après (Binder et al., 2003). 55
- Figure I-20.** Diagrammes de phase de DLPC/DPPC (a) et DMPC/DSPC (b). Il existe une différence de quatre groupes CH_2 entre chaque type lipidique dans chacun des mélanges. Une coexistence entre les phases liquide (L) et solide (S) apparaît dans les deux diagrammes. D'après (Knoll et al., 1991; Silvius et al., 1996)..... 57

- Figure I-21.** Miscibilité du DSPC avec un phospholipide hautement asymétrique (C_{18} - C_{10} -PC). En fonction de la quantité du lipide asymétrique, trois différents types de phases solides sont observées. D'après (Mason, 1988)..... 58
- Figure I-22.** Influence du Chol sur la structure de la bicouche lipidique composée d'un mélange DPPC-Chol. Une nouvelle phase apparaît pour des quantités de Chol supérieures à 10 mol% : la phase l_o . La transition de phase disparaît pour des niveaux supérieurs à 30 mol% Chol, pour laisser place uniquement à la phase l_o . D'après (Sankaram and Thompson, 1991)..... 61
- Figure I-23.** Les différentes structures que peut adopter une bicouche lipidique. D'après (Devaux and Morris, 2004)..... 62
- Figure I-24.** Le Chol peut convertir des phases l_d ou L_β de bicouches lipidiques en phase l_o . (a) Dans une membrane enrichie en glycérophospholipides (GPLs) à l'état liquide cristallin L_c , l'association du Chol aux GPLs, longs et saturés de préférence, induit l'apparition d'une phase plus ordonnée (b) Dans une bicouche lipidique composée de sphingolipides en phase solide ou gel L_β et de GPLs en phase L_c , le Chol conduit à la formation d'une phase liquide ordonnée riche en sphingolipides et Chol, coexistante avec une phase liquide cristalline désordonnée pauvre en Chol. D'après Expert Reviews in Molecular Medicine, 2002. 64
- Figure I-25.** Formation de domaines dans des GUVs composées de DOPC/Chol/SM (1/1/1) en fonction de la température. Visualisation des domaines grâce à la présence d'un marqueur lipidique (« Laurdan ») en microscopie à deux photons. D'après (Dietrich et al., 2001a)..... 65
- Figure I-26.** Détection de domaines lipidiques par AFM sur des mélanges de POPC/SM. a) 0% Chol, b) 20% Chol, c) 33% Chol, d) monocouche POPC pure. A droite de chaque série d'images sont représentées les échelles. D'après (Milhiet et al., 2001). 67
- Figure I-27.** Diagrammes de phase de bicouches lipidiques hydratées, préparées à partir de mélanges ternaires de palmitoyl-SM (PSpM), POPC, et Chol. Un diagramme de phase obtenu expérimentalement à 23°C est présenté en haut, et un diagramme de phase hypothétique à 37°C est présenté en bas. Dans chaque figure, la ligne en traits à 66 mol % Chol indique la limite hypothétique de solubilité du Chol dans la bicouche lipidique. Les régions principales du diagramme de phase ont été désignées de A à D. La région **A** indique une phase l_o seule. La région **B** correspond à une zone de coexistence de phases $s_o + l_o$. La région centrale triangulaire **C** est une zone où co-existent 3 phases: $l_d + l_o + s_o$. La région **D** désigne une zone de coexistence de 2 phases: $l_d + l_o$. Dans cette dernière région, une ligne en pointillés au niveau de la zone de composition 1:1:1 probable a été tracée. Finalement, des régions mineures au niveau de la base des diagrammes n'ont pas été légendées mais correspondent à une phase l_d simple, une région de co-existence de 2 phases : $s_o + l_d$ et une phase simple s_o . D'après (Simons and Vaz, 2004)..... 68
- Figure I-28.** Diagramme de phase montrant la coexistence de phase liquide-liquide d'un mélange ternaire: Chol, DOPC, Palmitoyl-SM (PSM) à 25°C. Les images en microscopie de fluorescence de vésicules géantes montrent les différents états membranaires pour des proportions DOPC/PSM/Chol variables. (a) 2:1 DOPC/PSM +30% Chol, (b) 1:19 DOPC/PSM +40% Chol, (c) 3:1 DOPC/PSM +10% Chol, (d) 1:2 DOPC/PSM +20% Chol. D'après (Veatch and Keller, 2005)..... 69
- Figure II-1.** Structure et formule chimique du C12NBD-PC. D'après www.avantilipids.com. 77
- Figure II-2.** Montage d'un extrudeur. (a) Membrane de polycarbonate ; (b) Un extrudeur est composé de deux seringues en verre et d'un cylindre à l'intérieur duquel la membrane de polycarbonate est maintenue, les passages à travers la membrane se font manuellement en poussant alternativement chacune des seringues ; (c) Stabilisateur d'extrudeur. 78

- Figure II-3.** Image d'une chambre d'électroformation. On distingue les deux électrodes de platine sur lesquelles est déposée la solution lipidique. 80
- Figure II-4.** Images de l'installation des éléments nécessaires à l'électroformation et à la visualisation des GUVs. (a) Lampe à fluorescence HBO, et unité Lambda 10-2 contrôlant le jeu de filtres sélectionnant les longueurs d'onde d'excitation; (b) générateur de courant alternatif branché sur les électrodes de la chambre de travail et oscilloscope ; (c) microscope sur lequel est posée la chambre de travail, et grâce auquel s'effectue la visualisation des GUVs en fluorescence. 80
- Figure II-5.** Exemples d'images de GUV homogène en contraste de phase (a) et en fluorescence (b) Du fait de l'absence de coexistence de phase, la sonde fluorescente se répartit de façon uniforme au sein de la membrane. 81
- Figure II-6.** Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre. 1 : lampe au xénon ; 2 : monochromateur d'excitation ; 3 : lame semi-transparente ; 4 : photomultiplicateur (mesure de la lumière incidente); 5 : échantillon (ou référence) ; 6 : monochromateur pour l'analyse du spectre de fluorescence ; 7 : photomultiplicateur (mesure de la fluorescence). 82
- Figure II-7.** Spectre d'absorbance et d'émission de fluorescence du NBD-PC. 83
- Figure II-8.** Intensité de fluorescence du C12NBD-PC mesurée à 538 nm pour des LUVs PC contenant différentes concentrations en C12NBD-PC. On observe une relation non linéaire entre l'intensité de fluorescence et le pourcentage en C12NBD-PC. Une diminution de la fluorescence dépendante de la concentration en C12NBD-PC apparaît pour des concentrations supérieures à 5 mol%. 83
- Figure II-9.** Schéma illustrant l'exclusion de la sonde C12NBD-PC de la phase l_o , et sa concentration dans la phase l_d consécutivement à l'apparition de domaines en phase l_o . (C_L : concentration locale ; C_M : concentration moyenne). 85
- Figure II-10.** Intensité de fluorescence spécifique du C12NBD-PC en fonction de la température (intensité I en a.u par μM de C12NBD-PC) dans des LUVs contenant 4 mol% C12NBD-PC, pour différentes compositions et états de phase : LUVs PC ; LUVs PC/SM 2:1 mol/mol; LUVs SM ; LUVs SM/Chol 1:1 mol/mol. Les courbes résultent de mesures ascendantes de température, aucune hystérésis significative n'a été observée dans les courbes correspondantes descendantes. 87
- Figure II-11.** Intensité de fluorescence spécifique du C12NBD-PC dans des membranes homogènes de LUVs de composition PC/SM 2:1 mol/mol en fonction de la concentration moyenne (C_M) du fluorophore à différentes températures comprises entre 4° et 70°C. Les points expérimentaux peuvent s'exprimer avec une fonction exponentielle (Brown et al., 1994). Le tracé des lignes qui se croisent donne la valeur d'une concentration locale (C_L) inconnue correspondant à une intensité de fluorescence spécifique I obtenue expérimentalement. L'exemple indiqué ici concerne la valeur I expérimentale obtenue pour des LUVs composées de PC/SM 2:1 et 20 mol% Chol à 4°C. $I = 37.16$ a.u./ μM , et $C_L = C_M(I) = 4.577$ mol%, d'après l'équation (10). 88
- Figure II-12.** Images de GUVs en fluorescence illustrant l'effet de la température (A1-A4) ou du contenu en Chol (B1-B4) sur l'importance de la fraction membranaire Φ_o , occupée par la phase l_o sur des vésicules membranaires. A1-A4, GUV formée de PC/SM/Chol 51:25:20 et 4 mol% C12NBD-PC montrant la formation progressive de domaines en phase l_o après diminution de la température au-dessous de la température de miscibilité. A1, 47°C, membrane homogène ; A2, 29°C, des domaines en phase l_o se sont formés, et sont visibles en tant que tâches sombres sur la membrane ; A3, 26°C ; et A4, 23°C, la fraction membranaire en phase l_o Φ_o augmente, pendant que celle en phase l_d Φ_d diminue avec le refroidissement. B1-B4, GUVs formées de PC/SM 2:1, 4 mol% C12NBD-PC, et Chol : B1, 0

mol% ; B2, 10 mol% ; B3, 20 mol% ; B4, 35 mol%, capture des images à 20°C. Notons que Φ_o est plus grand que Φ_d dans les GUVs contenant la plus haute proportion de Chol (B4). 90

Figure II-13. Courbes montrant le maximum d'intensité spécifique de fluorescence I du C12NBD-PC en fonction de la température (en a.u par μM de C12NBD-PC) pour des LUVs PC/SM 2:1 renfermant 4 mol% C12NBD-PC, et différentes proportions de Chol, comme indiqué..... 93

Figure II-14. Fraction membranaire occupée par la phase l_o , Φ_o (en $\Phi_o \times 100\%$), pour des LUVs PC/SM/Chol 2:1:X contenant entre 0 et 45 mol% Chol, à 4, 20, et 37°C. Φ_o a été calculée en utilisant l'équation (9) avec $C_L(I)$ provenant de l'équation (11). (A) : Dans le cas d'une partition idéale du C12NBD-PC dans les domaines en phase l_d ($k_p = 0$) ; (B) : Dans la cas d'une partition non-idéale : les molécules de C12NBD-PC partitionnent à des concentrations molaires différentes entre les phases l_d et l_o , préférant la phase membranaire l_d avec un coefficient de partition $k_p = 0.2$, équation (13). L'erreur expérimentale absolue pour l'estimation des fractions membranaires (en %) a été de $\pm 3.5\%$ 97

Figure II-15. Courbes montrant la dépendance à la température de l'intensité maximale de fluorescence spécifique du C12NBD-PC (intensité I en a.u par μM de C12NBD-PC) pour des LUVs contenant 4 mol% C12NBD-PC pour des mesures réalisées après montée de la température (courbes continues) et refroidissement (courbes en pointillés). Les courbes obtenues après refroidissement peuvent être considérées comme identiques à celles obtenues après chauffage (pour les compositions lipidiques présentées dans le graphique), dans notre précision expérimentale de 8%. 100

Figure III-1. Formule chimique du Triton X-100. 105

Figure III-2. Schéma représentant l'établissement du gradient de densité continu de sucrose..... 107

Figure III-3. Pourcentage de sucrose en masse (●) et densité (□) de chaque fraction issue du gradient après centrifugation. L'indice de réfraction et le pourcentage de sucrose ont été lus à l'aide d'un réfractomètre. Les densités correspondantes ont été déterminées ensuite à l'aide d'un index de densité de sucrose. 107

Figure III-4. Analyse par fractionnement après gradient de densité de sucrose des membranes résultant du traitement de LUVs (300 μM de lipides) à 4°C par différents pourcentages de TX-100 (w/v) : (□) 0% LUVs PC/SM 2:1 mol/mol. (○) 0.8% LUVs PC/SM 2:1 mol/mol. (▲) 0.8% LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol. (◇) 1.3 % LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol. Le contenu en [^3H]Chol de chaque fraction (1-10) est une signature de la répartition des structures lipidiques après centrifugation. La densité correspondante à chaque fraction est indiquée sur la figure III-3. 108

Figure III-5. Effet du traitement par 0.8% TX-100 (w/v) sur deux types de liposomes de composition : PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol, et PC/SM 2:1 mol/mol. Les fractions de basse et moyenne densité (1-4) renferment les membranes insolubles au détergent (TIFFs) ; les fractions de haute densité (5-10) renferment les membranes solubilisées (sous forme de micelles mixtes détergent-lipides)..... 110

Figure III-6. Analyse par fractionnement après gradient de densité de sucrose des membranes résultant du traitement de LUVs PC/SM 2:1 mol/mol (300 μM de lipides) par du TX-100 à 4°C. (A) Pourcentage de [^3H]Chol total pour chaque fraction: (◆) 0 % TX-100 (w/v) ; (□) 0.2 % TX-100 (w/v) ; (▲) 0.4 % TX-100 (w/v) ; (○) 0.6 % TX-100 (w/v) ; (●) 0.8 % TX-100 (w/v). (B) Pourcentage de TIFFs total dans les fractions (1-4) (Basse densité + moyenne densité, barres grises) du gradient de densité de sucrose après traitement des LUVs (PC/SM 2:1 mol/mol) avec du TX-100 à 4°C. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre deux expériences..... 111

Figure III-7. Analyse par fractionnement après gradient de densité de sucrose des membranes résultant du traitement de LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol (300 μM de lipides) par du Triton X-

100 à 4°C. (A) Pourcentage de TIFFs total dans les fractions 1 à 4 (Basse densité + moyenne densité, barres grises) et 1 à 3 (Basse densité) du gradient de densité de sucrose. (B) Pourcentage de [³H]Chol total pour chaque fraction: (◆) 0.1 % TX-100 (w/v); (□) 0.17 % TX-100 (w/v); (▲) 0.25 % Triton X-100 (w/v); (○) 0.4 % TX-100 (w/v); (■) 0.5 % TX-100 (w/v); (●) 0.6 % TX-100 (w/v). (C) Pourcentage de [³H]Chol total pour chaque fraction: (◆) 0.6 % TX-100 (w/v); (□) 0.7 % TX-100 (w/v); (▲) 0.8 % TX-100 (w/v); (○) 0.9 % TX-100 (w/v); (●) 1.0 % TX-100 (w/v)..... 114

Figure III-8. Pourcentage de TIFF total dans les fractions 1 à 4 (◇), 1 à 3 (■) et 4 (○) du gradient de densité de sucrose après traitement des LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) avec du TX-100 à 4°C. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre deux expériences. 115

Figure III-9. (A) Pourcentage de TIFFs total dans les fractions (1-3) en fonction d'un rapport particulier détergent/lipides $R_{TX/Lip}$. $R_{TX/Lip}$ est calculé en considérant seulement les lipides qui ne sont pas dans la phase l_o (100% pour les LUVs PC/SM 2:1 mol/mol et 80% pour les LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol). (■) LUVs PC/SM/Chol (53:27:20 mol/mol). (○) LUVs PC/SM (2:1) mol/mol. (B) Pourcentage du contenu en [³H]Chol de la fraction (2) en fonction du pourcentage en TX-100 (w/v) pour les LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 mol/mol. 118

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques uns des principaux acides gras saturés et insaturés retrouvés à l'état naturel. D'après (Nomenclature, 1978)..... 17

Tableau 2. Fluorescence du C12NBD-PC dans des membranes lipidiques homogènes composées de PC/SM 2:1 mol/mol. 89

Articles

1. Coste, V., Puff, N., Lockau, D., Quinn, P.J. and Angelova, M.I. (2006) Raft-like domain formation in large unilamellar vesicles probed by the fluorescent phospholipid analogue, C12NBD-PC. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 460-467.

2. Coste, V., Breton, M., Angelova, M.I. and Puff, N. (2006) How to extract selectively the lo-phase domains from large unilamellar vesicles with Triton X-100? *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **282–283**, 402–409.

Raft-like domain formation in large unilamellar vesicles probed by the fluorescent phospholipid analogue, C12NBD-PC

Virginie Coste^a, Nicolas Puff^a, Daniel Lockau^a, Peter J. Quinn^b, Miglena I. Angelova^{a,*}

^a Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR INSERM 538, CHU St Antoine, 27 rue Chaligny, Paris F-75012, France

^b Department of Biochemistry, King's College London, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, United Kingdom

Received 3 October 2005; received in revised form 20 February 2006; accepted 7 March 2006

Available online 31 March 2006

Abstract

The liquid-ordered/disordered-phase domain co-existence in large unilamellar vesicle membranes consisting of phosphatidylcholine: sphingomyelin (2:1) with different amounts of cholesterol has been examined using a concentration-dependent self-quenching of a single reporter molecule, C12NBD-PC. A temperature-dependent decrease of fluorescence intensity was associated with the expected formation and increase of l_o -phase membrane fraction in the vesicles. The result is consistent with exclusion of the fluorescent probe from the liquid-ordered phase which partitions preferentially into the liquid-disordered phase membrane domains. This leads to an increase of the local concentration of fluorophore in the liquid-disordered phase and a decrease of the quantum yield. This effect was used to obtain a quantitative estimation of the fraction of the vesicle membrane occupied by the liquid-ordered phase, Φ_o , as a function of temperature and cholesterol content between 0 and 45 mol%. The value of Φ_o was related to the assumed partition coefficient k_p of probe between liquid-ordered/disordered phases. For large unilamellar vesicles containing 20 and 4 mol% cholesterol and probe, respectively, with $k_p=0$ (probe completely excluded from liquid-ordered phase), $\Phi_o=0.16$ and with $k_p=0.2$, $\Phi_o=0.2$. The results are relevant to the action of detergent in the fractionation of detergent-resistant membrane from living cells. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Membrane phase co-existence; Liquid-ordered domain; C12NBD-PC; Cholesterol; Unilamellar vesicle

1. Introduction

Current interest in membrane microdomains or rafts is due to their putative functional role in processes such as signal transduction [1], protein and lipid sorting [2] cholesterol transport [3] and endocytosis [4]. The biochemical concept of lipid rafts in cell membranes emerged because of isolation of

detergent resistant membranes (DRMs) from cell lysates after treatment with detergents at certain temperatures and ratio detergent/cellular mass [5]. The attempt to relate the information acquired from studies of DRMs to the properties of rafts in living cell membranes has led to the investigation of model lipid membranes, exhibiting l_o/l_d phase co-existence under physiological conditions [6]. Phase diagrams of such “pro-raft” lipid mixtures have been constructed to establish the composition and phase boundaries for l_o domains in monolayers as well as a number of vesicular membrane systems including MLV, LUV, GUV [7,8]. Such systems have been investigated in order to characterize the size of l_o domains and, in the particular case of a ternary lipid mixture consisting of PC/SM/Chol, using time-resolved fluorescence resonance energy transfer methods [9].

In this work, we propose a general methodology for quantitative estimation of membrane fraction in l_o phase (Φ_o) in heterogeneous membrane LUVs. The model membrane examined consisted of LUVs of PC/SM/Chol 2:1:X (with cholesterol up to 45 mol%) extruded through 100 nm

Abbreviations: LUV, large unilamellar vesicle; GUV, giant unilamellar vesicle; SUV, small unilamellar vesicle; MLV, multilamellar vesicle; PC, egg yolk L- α -phosphatidylcholine; SM, egg yolk sphingomyelin; Chol, cholesterol; PC*, fluorescent lipid analogue C12NBD-PC (1-acyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine); C_M , mean molar concentration of PC*; C_L , local molar concentration of PC*; T_M , main phase transition temperature; l_d and l_o , liquid disordered and liquid ordered (cholesterol containing) L_α phases; Φ_d and Φ_o , membrane fraction occupied by l_d and l_o phases; k_p , l_o/l_d phase partition coefficient; DRMs, detergent resistant membranes

* Corresponding author. Tel.: +33 140011333; fax: +33 140011390.

E-mail address: angelova@ccr.jussieu.fr (M.I. Angelova).

polycarbonate filters. The concentration self-quenching properties of C12NBD-PC were employed in order to reveal the l_o/l_d phase co-existence and estimate membrane fractions in liquid disordered and liquid ordered phase, Φ_d and Φ_o , respectively (under the condition $\Phi_d + \Phi_o = 1$).

The NBD lipid analogues NBD-PE (head labeled) and NBD-PC (labeled at different positions of the chains) have been used for a broad range of studies involving biological and model membranes [10]. It is known that NBD fluorescence intensity in lipid membranes is modulated by two mechanisms: (i) effect of the environment on the NBD fluorescence, i.e., the membrane composition and structure (in particular, the phase state) [11–13] as well as by (ii) concentration-dependent NBD self-quenching, i.e., by the concentration of the NBD fluorophore in the lipid membrane [14]. Mazeret et al., [13] showed in their very comprehensive study that “... the fluorescence response of the NBD group was observed to strongly depend on the chemical structure and physical state of the host phospholipids and on the chemical structure of the lipid probe itself. Among the various fluorescence parameters studied, i.e., Stokes’ shifts, lifetimes, and quantum yields, the quantum yields were by far the most affected by these structural and environmental factors, whereas the Stokes’ shifts were practically unaffected. Thus, depending on the phospho-lipid probe and the host phospho-lipid, the fluorescence emission of the NBD group was found to vary by a factor of up to 5...” In addition, as originally proposed by Hoekstra [15], self-quenching has been recognized as dominant mechanism for change in the quantum yield of NBD in lipid membranes. An important feature of NBD lipid analogues is their unequal partitioning between the different lipid phases coexisting in a lipid membrane. Most studies using NBD-labeled lipid analogues were carried out with the head group labeled NBD-PE or NBD attached to fatty acid chains [16]. On the other hand, the chain labeled NBD-PCs appear to perturb the bilayer structure even more efficiently compared to the head-group labeled NBD-PEs. In the case of chain-linked NBD, the location of the NBD moiety imposes steric and polarity constraints in the hydrophobic region of lipid bilayer depending on the NBD position and the length of PC hydrocarbon chains. It has been suggested as well that NBD linked to the extremity of an acyl chain tends to approach the lipid water interface inducing chain kink [10,11,17]. The result is the almost perfect exclusion of, e.g., the C12NBD-PCs from ordered lipid phases and preferential accumulation of the labeled lipid into the disordered domains [16]. This was exploited by direct visualization of the segregation of cholesterol-rich domains in monolayers containing ordered lipid phases that preferentially exclude the fluorescent probe [18]. The l_o/l_d -phase domain co-existence in the bilayers of GUVs and monolayers of different lipid composition has been visualized directly by fluorescence microscopy using a variety of fluorescent probes [6,7]. The fluorescent molecules usually exhibited a preference for one of the two phases presumably due to the structural perturbation induced by the fluorescent amphiphilic molecule such as steric perturbation resulting from the presence of the bulky fluorophore, hydrophobic mismatch of different hydrocarbon chains, etc. Apparently the

l_d -phase more efficiently accommodates the fluorescent lipid analogues. Veatch and Keller [7] observed co-existence of l_o/l_d -phase domains in GUVs comprised of PC/SM/Chol in different proportions using Texas Red di(16:0)PE as a dye which partitions into the cholesterol-poor phase. Our studies of similar mixtures have used C12NBD-PC which by fluorescence microscopy reveals the l_o -phase domains as dark spots within the bright GUV membrane [19,20].

The results on GUVs suggest that the C12NBD-PC might be a useful tool for investigating membrane heterogeneity of LUVs using only one type reporter molecule. Fluorescence microscopy observations (possibly on GUVs but not on LUVs) revealed the almost complete partitioning of the probe into the l_d -phase domains of the membrane.¹

Hitherto fluorescence studies of l_o/l_d -phase membrane micro-heterogeneity of MLVs or LUVs have invariably involved two different reporter molecules. Such methods were based on fluorescent quenching, for example, of DPH by 12SLPC in MLVs [21,22] or, fluorescence resonance energy transfer (FRET), e.g., between NBD-PE and Rhod-PE in LUVs [9,23]. This approach is complicated by virtue of partition of both reporter molecules between lipid phases.

In this work, we investigated the l_o/l_d -phase domain co-existence in the membrane of LUVs using the concentration-dependent self-quenching of C12NBD-PC (PC*) alone. We observed a temperature-dependent decrease of fluorescence intensity that we interpret as the formation of and expansion of an l_o -phase domain in LUV membranes. This is rationalized as the effect of the presence of l_o -phase resulting in the effective decrease of membrane space available for PC* species which accumulate preferentially in the l_d -phase. The local concentration of fluorophore in the l_d -phase increases and quantum yield decreases. We used this effect to estimate of the fraction of LUV membrane occupied by l_o - (respectively, l_d -) phase as a function of temperature and PC/SM/Chol 2:1:X molar ratio for X between 0 and 45 mol%.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Egg yolk phosphatidylcholine (PC), egg yolk sphingomyelin (SM) and cholesterol (Chol) were purchased from Sigma (France). The lipophilic membrane probe C12NBD-PC (1-acyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine (PC*)) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

2.2. Preparation of liposomes

Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared using the extrusion method [24]. Samples were prepared by dissolving and mixing the indicated lipids in chloroform–methanol (9:1) to obtain the desired compositions thereafter the solvent was removed under a stream of oxygen-free dry nitrogen.

¹ The term “multicomponent membrane” refers to a membrane made of different lipid molecular species; the term “homogeneous lipid membrane” denotes the perfect miscibility of membrane lipids, and “heterogeneous lipid membrane” to indicate that lipid segregation into domains of different molecular composition takes place in the membrane.

The residues were subsequently maintained under reduced pressure for 1 h and then hydrated in 5 mM HEPES buffer at pH 7.5 to yield a lipid concentration of 1 mM. The samples were then vigorously mixed (vortexed) for 30 s at room temperature (23 °C) and heated at 65 °C for 30 min, vortexed again for 30 s to ensure more uniform vesicle dispersion and incubated again at 65 °C for 15 min. The use of temperatures above the main phase transition and phase separation of lipids aimed to obtain a homogeneous lipid mixture for the subsequent LUV preparation. The multilamellar vesicles were then extruded with a LiposoFast small-volume extruder equipped with polycarbonate filters (Avestin, Ottawa, Canada) as follows: 12 extrusions through 800 nm, and after that 21 extrusions through 100 nm filters. LUVs samples were kept at 4 °C, protected from light, until use. In the binary and ternary systems comprised of PC/SM, or PC/SM/Chol, the ratio PC/SM was always 2:1 mol/mol. C12NBD-PC concentration was 4 mol% unless otherwise stated.

Giant unilamellar vesicles (GUVs) were obtained by the electroformation method [25] in a temperature-controlled chamber following the particular protocol for heterogeneous GUV formation previously described [19]. GUVs were formed from PC/SM/Chol/PC* 51:25:*X*:4 mol/mol, at 34 °C (*X* being 0, 10, 20, 35 mol%). The raft-like (l_o) domains were visualized in fluorescence as previously described in [19]. The chain-labeled lipid analogue PC* is excluded from the ordered (l_o) phase and partitions predominantly in the disordered (l_d) phase. That makes the l_o domain appear as a dark round-shaped spot within the bright vesicle membrane.

2.3. Video microscopy

A Zeiss Axiovert 200M microscope (fluorescent unit fluo arc N HBO 103, Zeiss), equipped with a Lambda 10-2 unit (Sutter Instrument Co.), plus a CCD B/W chilled camera (Cool SNAP HQ), was used for GUV imaging. The set-up was piloted by Methamorph 6.0 software (Ropper Sci.). The morphology transformations and dynamics of the heterogeneous GUV membrane were followed in phase contrast and in fluorescence by Zeiss filter set 16 (Ex/Em=485/>520 nm).

2.4. Fluorescence measurements

Steady-state fluorescence measurements were carried out with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian Instruments, CA). Quartz cuvettes (1 cm × 1 cm) were used. Temperature was controlled by a thermostated cuvette holder (Varian Instruments, CA). C12NBD-PC fluorescence was excited at 470 nm, and emitted fluorescence maximum measured at 538 nm. Excitation and emission slits were adjusted to 5 nm. All fluorescence measurements were carried out at a total lipid concentration of 0.5 mM. Temperature scans of heating and cooling were performed with 15 measurements from 4 °C to 70 °C and back, allowing sample equilibration for 5 min at each temperature.

The derivation of quantitative fluorescence parameters was found to be dependent on small variations in the experimental procedure. The factors that give rise to variations include the method of preparation of LUVs, lipid concentration and bleaching and solvent evaporation during introduction of the fluorescent probe. Storage of LUVs for several days at 4 °C also resulted in vesicle aggregation. Reproducibility of the specific fluorescence intensity measurements between carefully prepared samples was ±8%. This error increased to ±15% in LUV containing 25 mol% cholesterol possibly because the l_o -phase dominates the bilayer of the LUV and small variations in cholesterol content of different vesicles may produce significant differences in total fluorescence intensity.

3. Results

3.1. C12NBD-PC fluorescence within homogeneous lipid membranes

It may be expected that for a homogeneous lipid bilayer LUV the mean membrane molar concentration of PC*, C_M , would be equal to the local membrane molar concentration, C_L , of the

probe at any location in the membrane. The same assumption should hold for the fluorescence intensity.

3.1.1. Effect of the environment within homogeneous membranes

The effect of the environment on the fluorescence intensity of C12NBD-PC embedded in homogeneous lipid bilayer membranes was examined first. Fig. 1 shows temperature dependence over the range 4° to 70 °C of specific fluorescence (recorded as intensity per μM of PC*) for 4 mol% PC* in LUVs of different lipid composition and phase state: PC, and PC/SM 2:1 mol/mol—in liquid disordered (l_d) phase; SM, which undergoes a transition between gel and liquid disordered (l_d) phase in the temperature range 35° to 40 °C; SM/Chol 1:1 mol/mol presenting only liquid ordered (l_o) phase over the entire temperature range [8]. Only heating curves are presented as the cooling curves can be superimposed on the heating curves. It can be seen that the NBD intensity in LUV of PC is similar to that of LUV consisting of PC/SM 2:1. Thus, the difference in lipid composition of the LUV does not have a significant effect on the fluorescence intensity for these two l_d -phase membranes. Furthermore, the main l_β to l_d phase transition of egg SM is clearly detected at about 38 °C [26]. Fluorescence is very low for SM/Chol 1:1 LUV (only l_o phase membranes). The NBD specific fluorescence intensity is higher in liquid disordered (l_d) phases than in gel or in liquid ordered (l_o) phases. A possible explanation might be that the NBD moiety at the extremity of the kinked PC hydrocarbon chain is expelled more efficiently from the hydrophobic region of bilayer when the latter is highly structured (as it is the case in gel or l_o phase) thereby exposing NBD closer to the water interface. It should be noted that the quantum yield of NBD fluorophore is close to zero in water and increases with decreasing polarity of the environment [27].

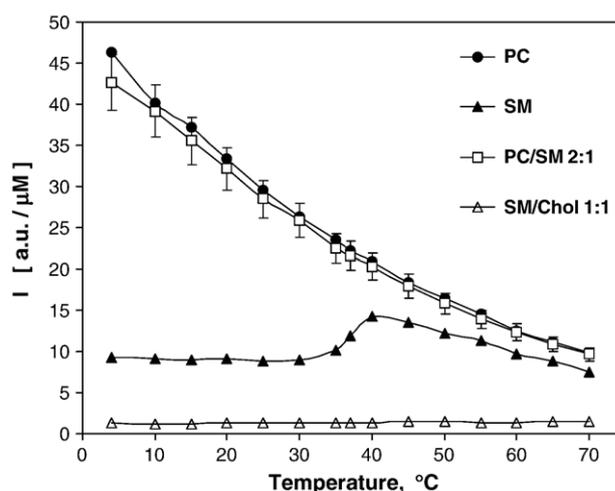


Fig. 1. Temperature dependence of C12NBD-PC (PC*) specific fluorescence intensity maximum I (in a.u. per μM of PC*) for 4 mol% PC* containing LUVs of different lipid compositions and phase states: PC, and PC/SM 2:1 mol/mol in liquid disordered (l_d) phase; SM in which the main l_β to l_d phase transition occurs at about 38 °C [26]; SM/Chol 1:1 mol/mol forming a liquid ordered (l_o) phase over the range of temperature examined. The data were recorded from heating curves and no significant hysteresis was observed in the corresponding cooling curves.

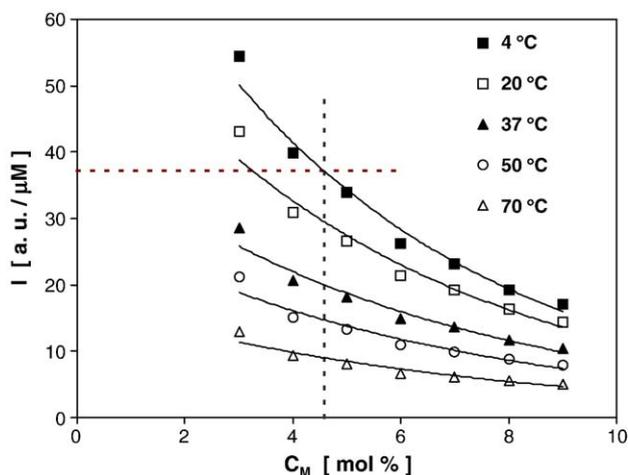


Fig. 2. Specific fluorescence of C12NBD-PC in homogeneous membrane LUVs of PC/SM 2:1 mol/mol as a function of mean concentration (C_M) of fluorophore at different temperatures. A close fit of the data to exponential functions is observed [14]. The intersecting dashed lines represent the value of an unknown local concentration C_L corresponding to an experimentally obtained specific fluorescence I . The example shown is for LUVs comprised of PC/SM, 2:1 containing 20 mol% cholesterol at 4 °C: with a value $I=37.16$ a.u./ μM , then $C_L=C_M(I)=4.577$ mol%, from Eq. (10).

With increasing temperature the bilayer becomes more disordered and is reflected as a monotonous decrease of fluorescence intensity (see [16]). This disorder presumably results in greater penetration of water molecules into disordered lipid bilayer, thereby increasing the polarity in the NBD environment with a consequent decrease in NBD fluorescence intensity. It is noteworthy that increasing the temperature of bilayers in an ordered physical state (gel for SM below T_M , or liquid ordered l_o phase for SM/Chol 1:1 for temperatures between 4 °C and 70 °C) does not change fluorescence intensity suggesting that ordered phases are relatively stable structures.

3.1.2. Concentration-dependent quenching of C12NBD-PC in homogeneous membranes

The specific fluorescence of C12NBD-PC in PC/SM 2:1 mol/mol LUVs plotted as a function of the mean concentration (C_M) of fluorophore at different temperatures between 4 °C and 70 °C is shown in Fig. 2. The concentration-dependent self-quenching of C12NBD-PC is clearly seen, for example, at 20 °C where the specific fluorescence intensity for 3 mol% probe is 3-fold greater than for a probe concentration of 9 mol%. The effect is less pronounced at higher temperatures. The experimental points are well fitted with exponential curves [14]:

$$I = I_0 e^{-\alpha C}, \text{ with} \\ C = C_M = C_L \text{ for homogeneous lipid membranes} \quad (1)$$

In Fig. 2, I and I_0 are in a.u. per μM of PC*, and C is in mol%. The corresponding values for I_0 and α are given in Table 1. Thus, the emitted specific fluorescence intensity, I , can serve as a “reporter” of C :

$$C(I) = 1/\alpha \ln(I_0/I), \quad (2)$$

3.2. C12NBD-PC fluorescence in heterogeneous lipid membranes

3.2.1. Experimental

If we consider a PC* containing vesicle of lipid composition in which there is (within a designated range of temperature) formation of l_o -phase domains then provided the temperature is above the miscibility transition temperature, the membrane is homogeneous and the mean molar membrane concentration of PC* in the membrane, C_M , is equal to the local membrane concentration, C_L , of the probe at any particular location in the membrane. The same assumption should hold for the specific fluorescence intensity. As temperature decreases below the miscibility temperature l_o -phase domains form spontaneously as illustrated in GUVs in Fig. 3A (A1 \rightarrow A2). Lowering the temperature leads to a further increase of the domain size, Fig. 3A (A2 \rightarrow A3 \rightarrow A4). This means that the membrane fraction in l_o -phase (Φ_o), increases and the membrane fraction in l_d -phase (Φ_d) correspondingly decreases, $\Phi_o + \Phi_d = 1$. On the other hand, at a given temperature, higher proportions of cholesterol induce larger Φ_o , see Fig. 3B for a qualitative illustration (temperature 20 °C and cholesterol content 0, 10, 20, and 35 mol%). Indeed it can be seen that Φ_o is greater than Φ_d in GUV comprised of PC/SM/Chol 41:20:35, (Fig. 3B4). The coexistence of the two liquid phases is observed as bright domains of l_d -phase within the dark l_o -phase membrane rather than dark l_o -phase domains within the bright l_d -phase membrane, i.e., the dispersion l_d/l_o phases occurs in the GUV PC/SM/Chol 2:1: X membranes for cholesterol content X between 20 and 35 mol%.

Phase separation of l_o -phase in LUV preparations has been examined by the fluorescent method during temperature scans and a summary of the results is presented in Fig. 4. It can be seen that increasing the proportion of l_o -phase in the cholesterol containing LUVs results in a corresponding decrease of membrane space into which PC* may partition. An inflection is observed at about 39 °C which may correspond to the miscibility transition and formation of l_o -phase domains upon cooling the sample. Below the miscibility transition, the local concentration, C_L , of fluorophore in the l_d -phase will be higher than the mean concentration, C_M . In this interpretation the specific fluorescence from heterogeneous LUV (PC/SM/Chol 2:1: X) will be lower compared with that of homogeneous LUV

Table 1
C12NBD-PC fluorescence in homogeneous lipid membranes consisting of PC/SM 2:1 mol/mol

T (°C)	I_0 (a.u./ μM of PC*)	α [1/mol%]	R^2
4	88.705	0.1901	0.9824
20	65.672	0.1746	0.9743
37	41.695	0.16	0.9697
50	30.058	0.1558	0.9612
70	17.769	0.1481	0.9497

Parameters of the calibration curves (exponential fits), $I(C)=I_0 e^{-\alpha C}$ of experimental data shown in Fig. 2 for the specific fluorescence of C12NBD-PC in homogeneous membrane LUVs of PC/SM, 2:1 mol/mol as a function of fluorophore mean concentration, $C_M=C_L=C$ [mol%], at different temperatures. R^2 is the fit correlation coefficient. Thus, the emitted fluorescence intensity, I , is the designator for C in the case of $C=C(I)=1/\alpha \ln(I_0/I)$.

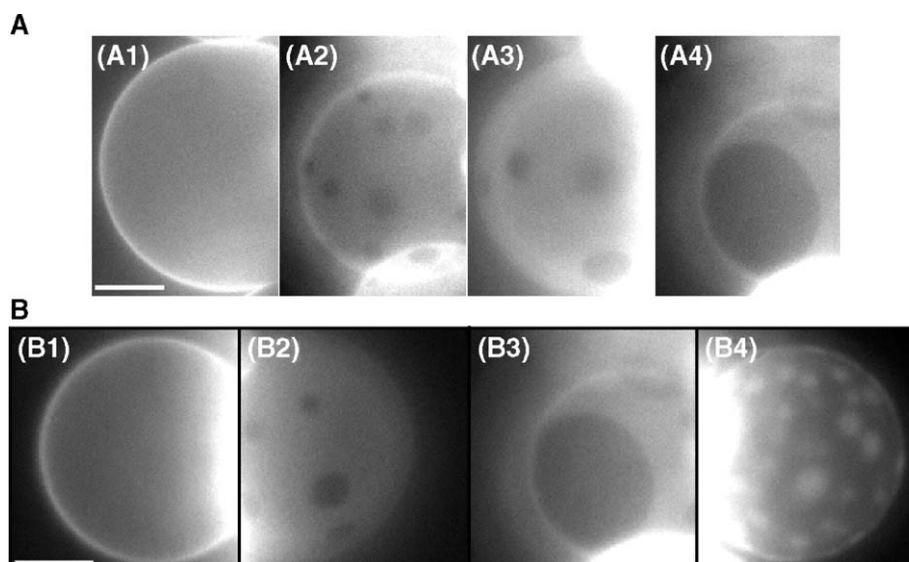


Fig. 3. Images of GUVs illustrating the effect of the temperature (A1–A4) or cholesterol content (B1–B4) on the membrane fraction, Φ_o , of l_o phase present in the vesicle membranes. A1–A4, GUV formed from PC/SM/Chol/PC* 51:25:20:4 show formation of l_o -phase domains and as the temperature is lowered through the miscibility temperature. A1, 47 °C, homogeneous membrane; A2, 29 °C, the l_o -phase domains have formed in the membrane, and are seen as dark spots; A3, 26 °C, and A4, 23 °C, the fraction of l_o -phase membrane (Φ_o) increases, and the membrane fraction in l_d -phase (Φ_d) decreases upon cooling. B1–B4, GUV formed from PC/SM, 2:1, containing 4 mol% PC* and, B1, 0 mol%; B2, 10 mol%; B3, 20 mol%; B4, 35 mol% cholesterol recorded at 20 °C. Note that Φ_o is greater than Φ_d in GUVs containing the highest proportion of cholesterol (B4).

(PC/SM 2:1) measured at the same temperature. Moreover, the higher the molar fraction of cholesterol in the bilayer (X between 10 and 45 mol%) the lower is the specific fluorescence intensity, I , brought about by the concentration-dependent self-quenching of the probe.

It is noteworthy that the self quenching effect is not linear with respect to increasing cholesterol content. For example, I is similar for 40 and 45 mol% of cholesterol, suggesting that the amount of SM available to complex with cholesterol is limiting in LUVs containing such high proportions of cholesterol.

An analysis of the fluorescence data has been performed to provide an estimate of the fraction of the membrane in l_o -phase, Φ_o . The difference between the specific fluorescence intensities,

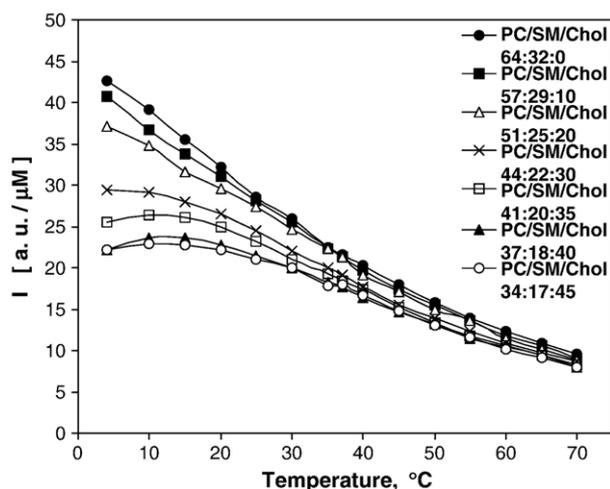


Fig. 4. Temperature dependence of C12NBD-PC (PC*) specific fluorescence intensity maximum I (in a.u. per μM of PC*) for 4 mol% PC* in LUVs containing different proportions of cholesterol, as indicated in the figure.

I , measured for l_o/l_d -phases LUVs has been used and, for LUVs only in l_d -phase, measurements were recorded at the same temperature. It is assumed that, as long as the probe remains embedded in l_d -phase lipid bilayer, the changes induced in NBD fluorescence due to its environment are negligible. Indeed, the l_d -phase observed in bilayers where there is coexistence of l_d/l_o -phases does not have a defined phospholipid composition as SM will preferentially complex with cholesterol leaving a PC-rich l_d -phase. Nevertheless, as seen in Fig. 1, the specific fluorescence intensity changes in LUV bilayers are small where the SM/PC molar ratio is between 0 and 1:2. The specific fluorescence intensity of C12NBD-PC can therefore be used to provide a quantitative estimate of the membrane fraction of LUVs occupied by l_o phase as a function of temperature and PC/SM/Chol 2:1: X molar ratio. A theoretical analysis is described below.

3.2.2. Theoretical

If we consider a homogeneous lipid vesicle of surface S , with a mean area per molecule A , containing a given number, N , of PC* molecules. The mean molar concentration of PC* (the number of PC* probe molecules per molecule) is $C_M = N/N_T$. (The total number of molecules in the vesicle, N_T , being $N_T = S/A$). The presence of l_o phase domains in the vesicle bilayer restricts the membrane space available for the PC* molecules which partition preferentially into the l_d phase, as explained in the previous section for a heterogeneous vesicle. This corresponds to a higher local PC* concentration, C_L , in the l_d phase. The local molar concentration of PC* will be $C_L = N_d/N_{dT}$, where N_d is the number of PC* molecules in the l_d phase and N_{dT} the total number of molecules in the l_d phase domain. $N_{dT} = S_d/A_d$ where S_d/A_d are, respectively, the membrane surface and the mean area per molecule in l_d phase. In practice, N_d is

lower than N , due to non-ideal exclusion of PC* molecules from the l_o phase. Indeed, certain number of PC* molecules would be expected to be present in the l_o phase.

For a vesicle containing N molecules of PC*, it follows that:

$$N = C_M \cdot (S/A), \text{ when} \\ C_L = C_M \text{ for the case of a homogeneous membrane,} \quad (3)$$

$$N_d = C_L \cdot (S_d/A_d), \text{ when} \\ C_L \neq C_M \text{ for the case of } l_o/l_d \text{ co-existence in the membrane,} \quad (4)$$

Dividing Eq. (4) by Eq. (3) one obtains:

$$S_d = S \cdot (C_M/C_L) \cdot (N_d/N) \cdot (A_d/A), \quad (5)$$

Here, $(N_d/N) \leq 1$, and $(A_d/A) \approx 1$, therefore, $S_d \leq S \cdot (C_M/C_L)$.

$S_d = S \cdot (C_M/C_L)$ represents an upper limit for the membrane surface occupied by l_d phase.

Accordingly, an upper limit for the membrane fraction, $\Phi_d = S_d/S$, occupied by l_d phase is defined and a lower limit obtained for the membrane fraction, $\Phi_o = S_o/S$, occupied by l_o phase domains, respectively:

$$\Phi_d = (C_M/C_L) \cdot (N_d/N) \cdot (A_d/A) \leq (C_M/C_L), \quad (6)$$

$$\Phi_o = 1 - (C_M/C_L) \cdot (N_d/N) \cdot (A_d/A) \geq 1 - (C_M/C_L), \quad (7)$$

$$(\Phi_o + \Phi_d = 1)$$

When there is ideal partitioning of PC* in the l_d -phase domains (all PC* molecules are restricted in the l_d -phase domains, i.e., $N_d/N=1$), and assuming $A_d=A$, one gets:

$$\Phi_d = (C_M/C_L), \quad (8)$$

$$\Phi_o = 1 - (C_M/C_L), \quad (9)$$

It can be seen that the experimental measurement of the local concentration of PC*, C_L , in the l_d phase permits the estimation of the membrane fractions, Φ_o and Φ_d , occupied by l_o or l_d phase, respectively.

3.2.3. Quantitative estimation of membrane fractions Φ_o and Φ_d , occupied by l_o and l_d phase using calibration curves

The experimental curves presented in Fig. 2 are calibration curves for the specific fluorescence of C12NBD-PC in LUV membrane of PC/SM 2:1 mol/mol, for probe concentrations between 3 and 9 mol% over the temperature range 4° to 70 °C.

Let us now consider the curves in Fig. 4 in this context. All LUV samples contain 4 mol% PC* mean concentration, C_M . Above the miscibility temperature, all the samples have $C_L = C_M = C$. Below the miscibility temperature, cholesterol containing LUVs show evidence of coexisting l_o/l_d membrane domains. In the latter case, the global specific intensity of a sample, I , will be the sum of the intensities originating from the different types of membrane domains bearing different PC* local concentrations and specific fluorescence intensities. If it is assumed there is ideal partitioning of PC* in the l_d phase all the fluorescence will originate from l_d -phase domains of the

membrane, $S_d = \Phi_d \cdot S$, with PC* concentration C_L higher than 4 mol%.

According to the theoretical model developed the same specific fluorescence intensity I would be emitted by homogeneous l_d -phase LUV sample, see Eqs. (1) and (2), with PC* mean concentration $C_M = C_L$:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha C_L}, \text{ or, } C_L(I) = 1/\alpha \ln(I_0/I), \text{ where } C_L > 4 \text{ mol\%} \quad (10)$$

where α and I_0 are given in Table 1.

A graphic method to obtain $C_L = C_L(I)$ is exemplified in Fig. 2 (see dashed lines) for LUVs consisting of PC/SM, 2:1 and 20 mol% cholesterol at 4 °C. For the measured $I=37.16$ a.u./ μM , and, from the calibration curve (i.e., from Eq. (10) at 4 °C), the corresponding $C_L(I)=4.577$ mol% is obtained. That gives, using Eqs. (8) and (9): $\Phi_d=0.874$, and $\Phi_o=0.126$. The experimental error for the estimate of membrane fractions was about ± 0.035 .

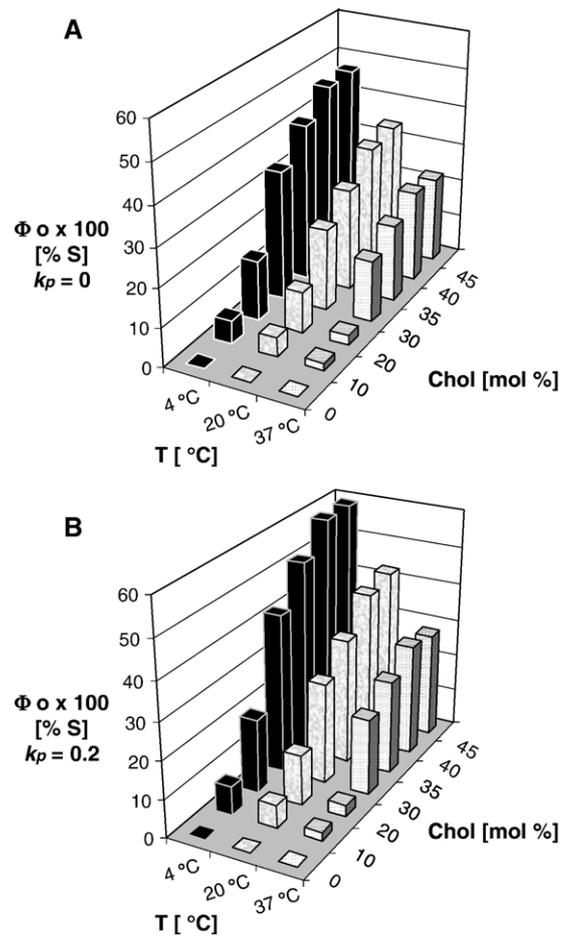


Fig. 5. The l_o -phase membrane fraction, Φ_o (as $\Phi_o \times 100\%$), for PC/SM/Chol 2:1: X LUVs containing between 0 and 45 mol% cholesterol, at 4, 20 and 37 °C. Φ_o was calculated using Eq. (9) with $C_L(I)$ from Eq. (11). (A) The case of ideal partitioning of PC* in the l_d -phase domains ($k_p=0$); (B) A real partitioning case: PC* molecules partition at different molar concentrations between l_o and l_d phases, favoring the l_d phase membrane with $k_p=0.2$, Eq. (13). The absolute experimental error for the membrane fractions estimation (in %) was about $\pm 3.5\%$.

The local PC* concentration in l_d phase resulting from the creation of l_o -phase domains can also be evaluated in another way. Since the experimentally measured specific fluorescence intensity of homogeneous LUVs depends on PC* concentration, C_M , then for a measured specific fluorescence, I , of a LUV of defined composition the corresponding local concentration $C_L = C_L(I)$ can be derived. In the example where $C_M = 4$ mol%:

$$C_L(I)/C_{4\%} = \ln(I_0/I)/\ln(I_0/I_{4\%}), \quad (11)$$

In fact both Eqs. (10) and (11) give $C_L = C_L(I)$, and can be used to obtain Φ_d and Φ_o from Eqs. (8) and (9).

Using Eq. (11) permits the expression of the phase membrane fraction Φ_o as a function of cholesterol content assuming $\Phi_o = 0$ for the sample with 0% cholesterol. For example, applying Eq. (11) for the graphic case in Fig. 2 one obtains:

$$I = 37.17 \text{ a.u./}\mu\text{M}; I_{4\%} = 42.6 \text{ a.u./}\mu\text{M}; C_L/C_{4\%} = 1.19;$$

$$C_L = 4.75 \text{ mol\%}; \Phi_d = 0.842; \Phi_o = 0.158.$$

By way of illustration, and assuming ideal partitioning of PC* in the l_d -phase domains, Fig. 5A shows the fraction of l_o -phase membrane, Φ_o (as $\Phi_o \times 100\%$), for PC/SM/Chol 2.1:X LUVs containing between 0 and 45 mol% cholesterol, at 4, 20 and 37 °C. Φ_o calculated using Eq. (9) with $C_L(I)$ from Eq. (11).

4. Discussion

This study demonstrates in the case of LUV that fluorescence emission from a single fluorescent probe partitioning between liquid domains in the membrane can be fit to a simple model. The model can be applied to obtain a quantitative estimation of membrane fractions characterizing the co-existence of the two liquid phases, the liquid disordered (l_d) phase, and the liquid ordered (l_o). The approach is similar to that reported by Brown and coworkers [14] who explained, in quantitative terms the observed changes in relative intensity and life-time properties of the NBD probe in lipid membranes by the self-quenching of this probe at high local concentrations due to energy migration and trap-site formation processes. The model membranes chosen for their study were small unilamellar vesicles (SUV) and monolayers of egg PC containing different concentrations of NBD-PE and were intended to provide a homogeneous distribution of the fluorophore. They noted that effective or “local” concentrations of fluorophore in heterogeneous membrane structures could be derived from the fluorescence intensity measurements.

In the present work, a heterogeneous membrane structure, LUV model membrane consisting of a ternary lipid mixture of PC, SM and cholesterol, was used for the investigation. In the quantitative estimation of the fraction of the membrane in l_o phase, Φ_o , presented in Fig. 5A, the probe is assumed to partition ideally into the l_d -phase domains and be excluded completely from the l_o -phase domains. Accordingly, a lower limit for the membrane fraction, $\Phi_o = S_o/S$, occupied by l_o phase domains is obtained. In practice, the PC* molecules partition in

different molar concentrations between the two phases but with a preference for the l_d -phase membrane. This is seen by direct observation of fluorescence from GUV (Fig. 3). Therefore, the actual membrane l_o fractions, Φ_o are somewhat greater than those shown in Fig. 5A. How much greater depends on the ratio between the molar concentrations of PC* in the co-existing l_o and l_d phases, i.e., on the partition coefficient k_p . A systematic study of partitioning of amphiphiles between coexisting ordered and disordered phases in two-phase lipid bilayer membranes has been reported [16] in which a partition coefficient $k_p \approx 0.2$ was obtained for different NBD-labeled lipids in a similar membrane system.

Taking into account $k_p \neq 0$, Eqs. (8) and (9) are replaced, respectively, by:

$$\Phi_d = [(C_M/C_L) - k_p]/(1 - k_p), \quad (12)$$

$$\Phi_o = [1 - (C_M/C_L)]/(1 - k_p), \quad (13)$$

Assuming $k_p \approx 0.2$ for C12NBD-PC, and, e.g., for LUVs (PC/SM)/Chol (2:1) : 20 mol%, at 4 °C, one obtains $\Phi_d = 0.842$ and $\Phi_o = 0.158$, instead of $\Phi_d = 0.874$ and $\Phi_o = 0.126$, obtained above in the case of ideal partitioning (when $k_p = 0$), and experimental error about ± 0.035 .

One of the possible applications of the present work is in the characterization of detergent-resistant membrane preparations isolated from membranes that contain putative domains of l_o -phase. Furthermore, the quantitative approach to estimation of domain fractions may be useful to establish the relationship between formation, stability and coexistence of liquid lamellar phases, l_o and l_d in model membranes and, in turn, on the dynamics of lipid rafts in biological membranes.

Acknowledgements

We thank German Trugnan and Michel Seigneuret for fruitful discussions. This work was supported by the CNRS/MR joint programme “Dynamics and Reactivity of Biological Assemblies”.

References

- [1] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Mol. Cell. Biol.* 1 (2000) 31–41.
- [2] K. Simons, G. van Meer, Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry* 27 (1988) 6197–6202.
- [3] K. Simons, E. Ikonen, How cells handle cholesterol, *Science* 290 (2000) 1721–1726.
- [4] P. Sharma, S. Sabharanjak, S. Mayor, Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 13 (2002) 205–214.
- [5] S. Schuck, M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. Simons, Resistance of cell membranes to different detergents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5795–5800.
- [6] C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, Lipid rafts reconstituted in model membranes, *Biophys. J.* 80 (2001) 1417–1428.
- [7] S.L. Veatch, S.L. Keller, Organization in lipid membranes containing cholesterol, *Phys. Rev. Lett.* 89 (2002) 268101.
- [8] R.F. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophys. J.* 85 (2003) 2406–2416.

- [9] R.F. de Almeida, L.M. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study, *J. Mol. Biol.* 346 (2005) 1109–1120.
- [10] A. Chattopadhyay, Chemistry and biology of *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labelled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes, *Chem. Phys.* 53 (1990) 1–15.
- [11] A. Chattopadhyay, E. London, Spectroscopic and ionization properties of *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labelled lipids in model membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 938 (1988) 24–34.
- [12] D.J. Brennan, R.S. Brown, C.P. McClintock, U.J. Krull, Fluorescence transduction of an enzyme–substrate reaction by modulation of lipid membrane structure, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 253–263.
- [13] S. Mazeris, V. Schram, J.F. Tocanne, A. Lopez, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl-labelled phospholipids in lipid membranes: differences in fluorescence behavior, *Biophys. J.* 71 (1996) 327–335.
- [14] R.S. Brown, J.D. Brennan, U.J. Krull, Self-quenching of nitrobenzoxadiazole labelled phospholipids in lipid membranes, *J. Chem. Phys.* 100 (1994) 6019–6027.
- [15] D. Hoekstra, Fluorescence method for measuring the kinetics of Ca²⁺-induced phase separations in phosphatidylserine-containing lipid vesicles, *Biochemistry* 21 (1982) 1055–1061.
- [16] R.M. Mesquita, E. Melo, T.E. Thompson, W.L. Vaz, Partitioning of amphiphils between coexisting ordered and disordered phases in two-phase lipid bilayer membranes, *Biophys. J.* 78 (2000) 3019–3025.
- [17] D. Huster, P. Muller, K. Arnold, A. Herrmann, Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine, *Biophys. J.* 80 (2001) 822–831.
- [18] L.A. Worthman, K. Nag, P.J. Davis, K.M. Keough, Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy, *Biophys. J.* 72 (1997) 2569–2580.
- [19] G. Staneva, M.I. Angelova, K. Koumanov, Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes, *Chem. Phys. Lipids* 129 (2004) 53–62.
- [20] G. Staneva, M. Seigneuret, K. Koumanov, G. Trugnan, M.I. Angelova, Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles. A direct microscopy observation, *Chem. Phys. Lipids* 136 (2005) 55–66.
- [21] S.N. Ahmed, D.A. Brown, E. London, On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble. Liquid-ordered lipid phase in model membranes, *Biochemistry* 36 (1997) 10944–10953.
- [22] X. Xu, R. Bittman, G. Duportail, D. Heissler, C. Vilcheze, E. London, Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33540–33546.
- [23] L.M. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, Fluid–fluid membrane microheterogeneity: a fluorescence resonance energy transfer study, *Biophys. J.* 80 (2001) 776–788.
- [24] R.C. MacDonald, R.I. MacDonald, B.P. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L.R. Hu, Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1991) 97–303.
- [25] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986) 303–311.
- [26] W.I. Calhoun, G.G. Shipley, Fatty acid composition and thermal behavior of natural sphingomyelins, *Biochim. Biophys. Acta.* 555 (1979) 436–441.
- [27] S. Lin, W.S. Struve, Time-resolved fluorescence of nitrobenzoxadiazole-aminohexanoic acid: effect of intermolecular hydrogen-bonding on non-radiative decay, *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 361–365.

How to extract selectively the l_o -phase domains from large unilamellar vesicles with Triton X-100?

Virginie Coste, Michelyne Breton, Miglena I. Angelova*, Nicolas Puff

Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, UMR INSERM 538, CHU St-Antoine, 27 rue Chaligny, Paris F-75012, France

Received 6 October 2005; received in revised form 20 December 2005; accepted 21 December 2005

Available online 14 February 2006

Dedicated to Professor Ivan B. Ivanov (LCPE, University of Sofia) on the occasion of his 70th birthday.

Abstract

The structural transition stages induced as a result of interaction at 4 °C of the Triton X-100 with large unilamellar vesicles (LUVs) were studied by means of a sucrose flotation procedure similar to that used to isolate biological detergent resistant membranes (DRMs). Flotation of lipid structures after centrifugation was determined on the basis of the [1α , 2α (n)- ^3H]-cholesterol content of each fraction of a 40–35–5% sucrose density gradient. We measured the amount of Triton X-100 insoluble floating fractions (TIFFs) for different lipid compositions of large unilamellar vesicles and different effective detergent to lipid ratios. At 4 °C and for two-component lipid membrane (PC/SM 2:1, mol/mol), an effective detergent to lipid ratio of 50 is necessary to complete membrane solubilization. When liquid-ordered and liquid-disordered phase domains coexist in the vesicle membrane (PC/SM/Chol 53:27:20, mol/mol), complete solubilization occurs at higher effective detergent to lipid ratio. This is consistent with a higher resistance of the liquid-ordered phase to detergent extraction. Nevertheless, in the case of heterogeneous (l_o/l_d phase) vesicles, and for a range of effective detergent to lipid ratios promoting incomplete solubilization, we detected in TIFF intermediate density structures which did not exist for two-component lipid membranes (PC/SM 2:1, mol/mol). We interpreted these results in relation with recent findings of our group and propose a mechanism for heterogeneous large unilamellar vesicle solubilization. We show that for lipid bilayers exhibiting l_o/l_d phase co-existence, a specific effective detergent to lipid ratio allowing the isolation of pre-existing tightly packed ordered domains can be found, but, in any case, certain amount of the detergent is presented in floating fraction membranes.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Rafts; DRMs; l_o -phase domains; Triton X-100; LUV

1. Introduction

Detergent interactions with membranes were actively explored during the past decades after it was first appreciated that detergent solubilization was useful for isolating and characterizing membrane proteins [1,2]. More recently, it was shown that detergent can solubilize differentially membrane domains in different physical states [3]. The discovery of these detergent resistant membranes (DRMs) led to a novel description

of the cellular membrane emphasizing that the self-organizing properties of particular lipids drive the formation of specialized domains called rafts [4]. This lateral organization may have a huge role in cell signaling since the different lipid environments lead to an inhomogeneous membrane protein distribution [5–7]. Measurement of the insolubility of lipids in detergents has therefore become a useful method for probing the structure of biological membranes. Another important finding was that DRMs are enriched in sphingomyelin (SM) and cholesterol (Chol) [8]. For particular composition and temperature intervals, model membranes present as well lateral phase separation of liquid-disordered phase (l_d) and liquid-ordered phase (l_o) rich in SM and Chol [9–11]. Because of these similarities, rafts are identified with l_o -phase domains [12,13] although the composition of the later, according to phase diagrams made on model membrane could be multiple. In any case, these results stimulated many studies on artificial lipid membranes, exhibiting

Abbreviations: DRMs, detergent resistant membranes; PC, egg yolk L- α -phosphatidylcholine; SM, egg yolk sphingomyelin; Chol, cholesterol; l_d and l_o , liquid-disordered and liquid-ordered (cholesterol containing) L_α phases; TX-100, Triton X-100; LUV, large unilamellar vesicle; TIFFs, Triton X-100 insoluble floating fractions; [^3H]Chol, [1α ; 2α (n)- ^3H]-cholesterol

* Corresponding author. Tel.: +33 140011333; fax: +33 140011390.

E-mail address: angelova@ccr.jussieu.fr (M.I. Angelova).

l_o/l_d phase co-existence as minimal model for raft-like domains containing membrane [10,14–17].

Despite the elements described above, biological membrane rafts still remain quite enigmatic as structural entities so that their existence has been challenged [13,18,19]. As a matter of fact, non destructive direct approaches (fluorescent microscopy or single particle tracking for example) have not yet yielded fully consistent results [20–22]. The detergent approach which identifies rafts as DRMs, i.e. membrane fractions which resist to solubilization by detergent (Triton X-100, Brij 98, LUBROL. . .) lead to a host of potential problems. First of all, performing solubilization at low temperature (4 °C) can lead to an overestimation of the amount of raft material. Very low temperature can indeed modify the physical state of the lipids of cellular membrane increasing or, even inducing, lateral lipid phase separation which may not have been present at 37 °C [13]. Moreover, lipid and protein compositions and amounts found in DRMs depend strongly on the nature of the detergent used and other experimental conditions [23]. This raises the major question as whether DRMs constitute an accurate measurement of the amount of the raft domains prior to detergent addition. To answer this question, model membrane exhibiting l_o/l_d phase co-existence appears to be useful. The degree of lipid insolubility depends on the stability of lipid–lipid interactions relative to lipid–detergent interactions. Therefore, a minimal system composed exclusively of phosphatidylcholine (PC), SM and Chol can lead to a better understanding of the detergent extraction process which is viewed in fact, as a selective solubilization of the lipid bilayer [24–28].

The solubilization of homogeneous lipid membranes is usually described by a three-stage model [29]. In the first stage, at low effective detergent to lipid ratios, the detergent is distributed between the aqueous medium (as a monomer) and the lipid bilayers. When a first critical detergent mole fraction is reached, mixed detergent–lipid micelles appeared in co-existence with detergent-saturated membranes. This is a state of partial or incomplete solubilization. The third stage is reached when complete solubilization occurs and all membranes disappear. So, the key parameter controlling the degree of solubilization is the effective detergent to lipid ratio which depends strongly upon the physical state of the lipid bilayer and as a consequence, of the lipid composition and temperature [24,26,30]. The situation becomes more complex – but more ‘biologically relevant’ – when the bilayer exhibits l_o/l_d phase co-existence because one has to consider the different lipid phase–detergent interactions. l_o membrane domain has been shown to be more resistant to solubilization by detergents than the l_d membrane domain because of a specific SM/Chol interaction [26]. This finding is consistent with the shared idea that ‘DRM = l_o domain’. However, Heerklotz et al. [24,28,31] have shown that Triton X-100 (TX-100) could promote – or even more induce – the l_o membrane domain formation. Nonideal interactions between detergents and order-preferring lipids are a possible driving force for such an effect. On the basis of such conflicting results, one can see that detergent extraction in order to evaluate domain structure and compositions prior to detergent addition did not yet provide actually definitive answers to question about raft existence.

In the present work, the structural transitions induced by the interaction of the TX-100 with large unilamellar vesicles (LUVs) at 4 °C were studied by means of a sucrose flotation procedure similar to that used to isolate biological DRMs. Flotation of lipid structures after centrifugation was determined on the basis of the [1α , 2α (n)- ^3H]-cholesterol (^3H Chol) content of each fraction (1–10) of a 40–35–5% sucrose density gradient. We measured the amount of Triton X-100 insoluble floating fractions (TIFFs) at varying effective detergent to lipid ratio and for different physical states of the lipid bilayers. Our results show that depending on the effective detergent to lipid ratio, it is possible to obtain floating fractions and complete solubilization of the lipid bilayers for two-component lipid membranes (PC/SM 2:1, mol/mol) and heterogeneous (l_o/l_d phase co-existence) membranes. However, when the bilayer exhibits l_o/l_d phase co-existence, the solubilization process is much more complex. We interpreted our results with regards of recent findings of our group [25]. We tried to evaluate the appropriate effective detergent to lipid ratio which permits us to obtain the TIFF corresponding as much as possible to the l_o domains existing in the LUV membranes before detergent addition.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Egg yolk phosphatidylcholine (PC), egg yolk sphingomyelin (SM), Cholesterol (Chol) and Triton X-100 were purchased from Sigma (France). Radiolabeled cholesterol [1α , 2α (n)- ^3H]-cholesterol was obtained from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK).

2.2. Preparation of liposomes

Large unilamellar vesicles were made using the extrusion method [32]. Briefly, samples were prepared by mixing the indicated lipid stock solutions to obtain the chosen compositions. Thereafter, lipid mixtures were dried from a chloroform-methanol solution under a stream of nitrogen and further dried under vacuum for at least 1 h. The lipid films were hydrated in a TNC buffer (Tris–HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5) to yield a lipid concentration of 1 mM. The samples were then vigorously vortexed for 30 s at room temperature (23 °C), and heated at 65 °C for 30 min, sonicated, vortexed again for 30 s to ensure more uniform vesicles dispersion and placed again to 65 °C bath for 15 min (exceeding the main phase transition temperature of lipid mixture components as well as that of immiscibility in order to obtain homogeneous lipid mixtures for the subsequent LUV preparation). The multilamellar vesicles were then extruded with a LiposoFast small-volume extruder equipped with polycarbonate filters (Avestin, Ottawa, Canada) with: 12 extrusions through 800 nm followed by 21 extrusions through 100 nm filters. LUV samples were kept at 4 °C, protected from light, until use. Radiolabeled LUVs were prepared as described above except a trace amount (1 $\mu\text{Ci/ml}$) of [^3H]-Chol (35 Ci/mmol, Amersham Biosciences, Roosendaal, The Netherlands) was added to the lipid mixtures before drying. In the

binary and ternary systems made of PC/SM, or PC/SM/Chol, the ratio PC/SM was always 2:1 (mol/mol).

2.3. Triton X-100 insoluble floating fraction

TIFF were obtained from LUVs containing [^3H]Chol (0.8 ml, 300 μM lipids) by treatment with different percentage of TX-100 (w/v) as indicated, in TNC (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM) buffer pH 7.5, at 4 $^\circ\text{C}$ for 30 min or otherwise stated. Subsequently, the detergent-LUV sample was mixed with 80% sucrose (w/v) to a final concentration of 40% sucrose in a final volume of 1.6 ml and placed on the bottom of an ultracentrifuge tube. Then, an 1.6 ml layer of 35% sucrose (w/v) in TNC, and an 1.6 ml layer of 5% sucrose (w/v) in TNC were over layered in order to make the density gradient. The gradients were then subjected to ultracentrifugation in a Beckman SW55 Ti rotor for 18 h at 180,000 $\times g$ at 4 $^\circ\text{C}$. After centrifugation, fractions of 500 μl were collected, starting from the top of the gradient. Aliquots were removed to determine the amount of [^3H]Chol in each fraction by liquid scintillation counting. Experiments were reproduced at least twice. Results are quite reproducible if the different fractions after ultracentrifugation are carefully collected. For 0.75% TX-100 (w/v), no substantial variation of the [^3H]Chol extent was detected when LUVs were treated during 5, 15, 30 or 120 min (data not shown). To evaluate the density in each collected fraction, the refractive index and percent sucrose by weight were read using a refractometer (Atago, Japan). The corresponding densities were then determined using a sucrose density index.

3. Results

3.1. Evaluation of the presence of TIFFs in LUVs

To evaluate the presence of Triton X-100 resistant membranes in liposomes, LUVs (300 μM lipids) were treated with TX-100 at 4 $^\circ\text{C}$ for 30 min and subjected to a density gradient flotation analysis. Triton X-100 insoluble fractions floating to the top of a 40–35–5% sucrose density gradient were detected by the [^3H]Chol initially incorporated in the LUVs.

When no Triton was added to the vesicles (Fig. 1), almost 90% of the [^3H]Chol total content was detected in the first four fractions (1–4). These vesicle-containing fractions correspond to the lowest density fractions of the sucrose gradient (Fig. 2). It is probably due to the very low membrane permeability for sucrose in the absence of detergent. So, buffer containing vesicles are simply floating in the sucrose solution. The 10% remaining distributed into the fractions 5–10 may come from micelles or “high density structures” existing after the extrusion process which remained in the bottom of the ultracentrifugation tube. Consequently, the [^3H]Chol content calculated in the fraction 5–10 when no Triton was added, was considered as “background noise” and systematically subtracted from the total [^3H]Chol content. When Triton was added to the vesicles in non complete solubilizing amount, the total [^3H]Chol content could be separated in two major contribution (Fig. 1, for data \blacktriangle and \circ). The first one, corresponding to the fractions 1–4, i.e. to the densities

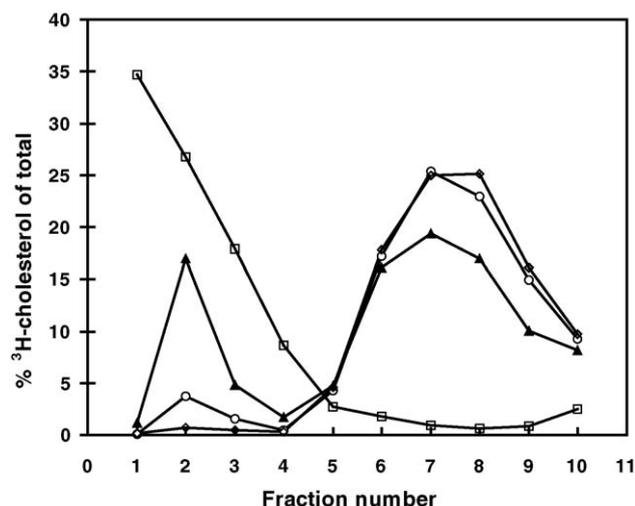


Fig. 1. Flotation of Triton insoluble fractions after treatment of LUVs (300 μM lipid) at 4 $^\circ\text{C}$ with different Triton X-100 percentages (w/v). 0%, LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol) (\square), 0.8%, LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol) (\circ) and LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) (\blacktriangle). 1.3%, LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) (\diamond). Flotation of lipid structures after centrifugation was determined on the basis of the [^3H]Chol content of each fraction (1–10). The density corresponding of each fraction is given in Fig. 2.

1.029–1.076 kg/m^3 (Fig. 2), was considered as TIFFs. The second one (fractions 5–10, densities 1.105–1.160 kg/m^3 , Fig. 2) corresponds to the detergent soluble fractions of the membrane and is mainly composed of mixed detergent–lipid micelles. One example is given in Fig. 1 for 0.8% Triton X-100 (w/v) and two different sorts of liposomes. One can see that in comparison with the case without Triton added, the [^3H]Chol content increased in the fractions (5–10) and decreased in the fractions (1–4). This is a signature of a partial solubilization of the vesicle membranes [33]. Furthermore, the total [^3H]Chol content measured in TIFFs of “pro-rafts” vesicles (PC/SM/Chol 53:27:20, mol/mol) – i.e. bilayer exhibiting l_o/l_d phase co-existence [11] – was higher

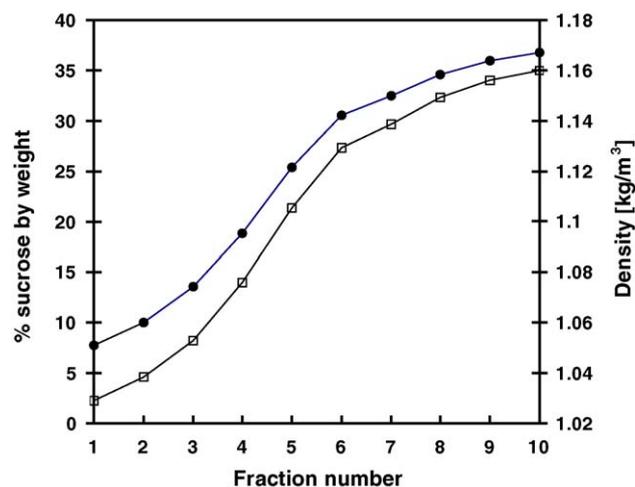


Fig. 2. Percent sucrose by weight (\bullet) and density (\square) of each gradient fraction after centrifugation. The refractive index and percent sucrose were read using a refractometer. The corresponding densities were then determined using a sucrose density index. Fractions (1–3), (4) and (1–4) are called respectively Low density, Medium density and Low + medium density fractions.

than the one with two-component lipid vesicles (PC/SM 2:1, mol/mol). The total membrane solubilization occurred when no, or very few, radiolabeled Chol was detected in the four first fractions (example in Fig. 1, data \diamond).

3.2. TX-100 concentration dependence of TIFFF

To investigate in more details the resistance of membranes to detergent solubilization we used the same flotation procedure, but with variable amounts of Triton X-100. Experiments were done with two-component lipid vesicles and for heterogeneous, domain-forming membranes which solubilization followed a more complicated way [28].

3.2.1. Two-component lipid membranes

For the PC/SM 2:1 (mol/mol) vesicles, we studied the Triton X-100 effect for the range 0–0.8% (w/v). The lipid amount was fixed at 300 μ M. Fig. 3A presents the percent [3 H]Chol content of total for each fraction of the sucrose density gradient for different TX-100 percentages. In comparison with the case without Triton added (Fig. 3A, data \blacklozenge), it can be remarked that the initial floating structures are partly solubilized and that the TIFFFs are now principally composed of structures (Fig. 3A, data \square , \blacktriangle , \circ and \bullet) of fraction (2) density. The partial solubilization of the initial floating structures indicate that, till 0.2% TX-100 (w/v), we are above the effective saturating detergent to lipid ratio. So, these structures should correspond to smallest vesicles than the initial ones which membranes are saturated with detergent. Fig. 3B summarizes the results obtained (% TIFFF content of total) for the different Triton percentages used. Increasing the TX-100 amount lead little by little to the disappearance of TIFFFs. For the rest, the decrease is nearly linear (Fig. 6B, data \circ). For 0.8% (w/v) TX-100, the amount of floating fractions is weak that point to the total solubilization of the membrane may occur around 0.9%.

In the case of pure l_0 phase vesicles (SM/Chol 1:1, mol/mol), no solubilization occurred up to 2.5% TX-100 w/v (more than 90% of the [3 H] total content was found in the Triton insoluble floating fractions, data not shown).

3.2.2. Heterogeneous (l_0/l_d phase) LUVs

We used PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) vesicles whose membranes exhibit a l_0/l_d phase co-existence [11,17,25]. The Triton X-100 range was 0–1.3% (w/v) for a fixed amount of lipid of 300 μ M. Fig. 4A presents the results obtained with the different TX-100 percentages used. As for the two-component lipid vesicles (PC/SM 2:1, mol/mol) (Fig. 3B), one can see that the TIFFF amount (fractions 1–4) decreases when the effective detergent to lipid ratio increases (Fig. 4A, grey bars). The lipid membrane is first partially solubilized – indicating that at least the effective saturating detergent to lipid ratio of the l_d -phase is reached – and then totally micellized at 1.2% TX-100 (w/v). The total solubilization of the membranes point to that at 1.2% TX-100 (w/v), the effective saturating detergent to lipid ratio of the l_0 -phase is also reached. So, the solubilization process of the heterogeneous lipid bilayer seems to be similar to the two-component lipid one but with a shift to higher percentage of

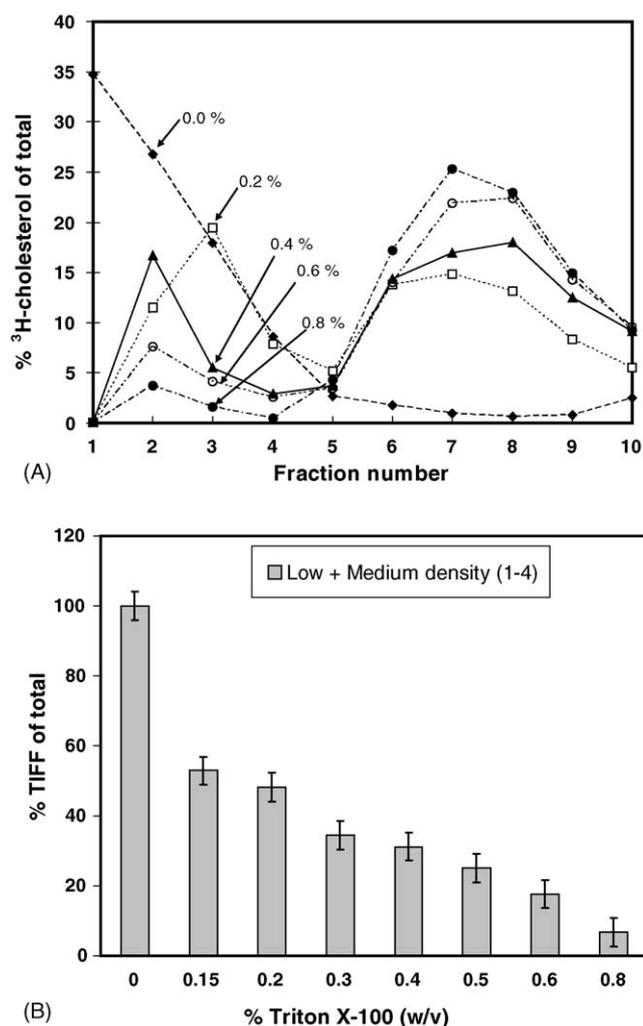


Fig. 3. Flotation of TIFFFs after treatment of LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol) (300 μ M lipid) with Triton X-100 at 4 $^{\circ}$ C. Flotation of lipid structures after centrifugation was determined on the basis of the [3 H]Chol content of each fraction (1–10). (A) Percent [3 H]Chol of total for each fraction: (\blacklozenge) 0% TX-100 (w/v). (\square) 0.2% TX-100 (w/v). (\circ) 0.4% Triton X-100 (w/v). (\triangle) 0.6% TX-100 (w/v). (\bullet) 0.8% TX-100 (w/v). (B) Percent TIFFF of total in the fractions (1–4) (Low density + medium density, grey bars) of the sucrose density gradient after treatment of LUVs (PC/SM 2:1, mol/mol) with Triton X-100 at 4 $^{\circ}$ C. Error bars represent the standard deviation between two experiments.

TX-100. This is consistent with the higher detergent resistance of the l_0 -phase usually described in the literature [26].

But, there are also important differences between the solubilization processes if a precise analysis of the floating fractions is done. Addition of small amounts of TX-100 till 0.25% (w/v) shifts the initial lipid structures to higher density ones (around 1.076 kg/m 3 , fraction 4) (Fig. 4B). For 0.1–0.25% TX-100 (w/v), the [3 H]Chol of floating fractions is principally found in the fourth fraction corresponding to medium density structures (1.076 kg/m 3 , Fig. 2) that did not exist for two-component lipid vesicles (PC/SM 2:1, mol/mol). When the TX-100 amount still increases (0.4–0.6% TX-100 w/v), there is a slight translation of this maximum toward the fraction (2), i.e. the low density structures. This phenomenon is probably due to an increasing incorporation of the detergent in the l_0 domain membranes

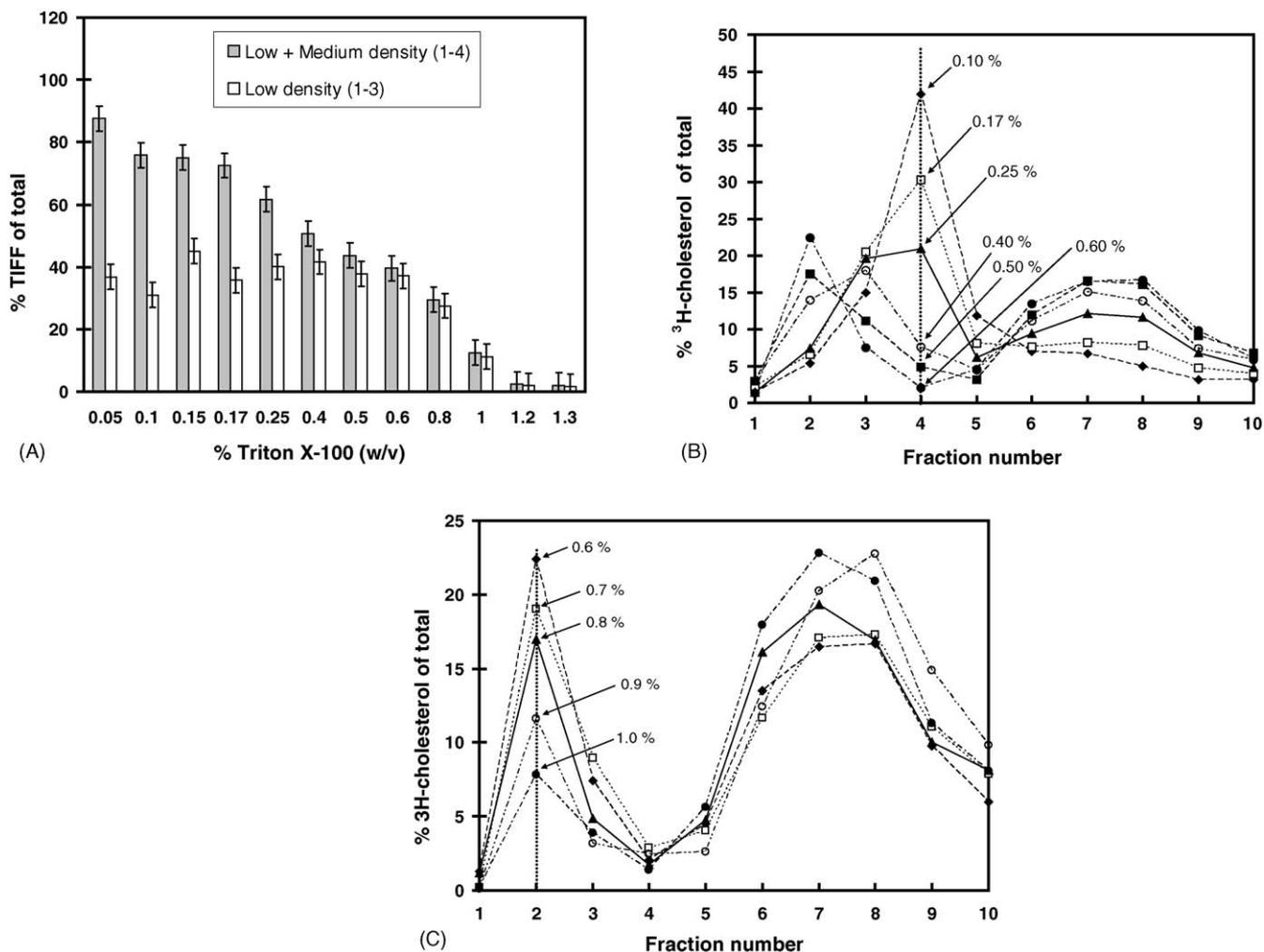


Fig. 4. Flotation of TIFFs after treatment of LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) ($300\ \mu\text{M}$ lipid) with Triton X-100 at $4\ ^\circ\text{C}$. Flotation of lipid structures after centrifugation was determined on the basis of the $[\text{}^3\text{H}]\text{Chol}$ content of each fraction (1–10). (A) Percent TIFF of total in the fractions 1–4 (low + medium density fractions, grey bars) and 1–3 (low density fractions, white bars) of the sucrose density gradient. Error bars represent the standard deviation between two experiments. (B) Percent $[\text{}^3\text{H}]\text{Chol}$ of total for each fraction: (\blacklozenge) 0.1% TX-100 (w/v). (\square) 0.17% TX-100 (w/v). (\circ) 0.25% Triton X-100 (w/v). (\triangle) 0.4% TX-100 (w/v). (\blacksquare) 0.5% TX-100 (w/v). (\diamond) 0.6% TX-100 (w/v). (C) Percent $[\text{}^3\text{H}]\text{Chol}$ of total for each fraction: (\blacklozenge) 0.6% TX-100 (w/v). (\square) 0.7% TX-100 (w/v). (\circ) 0.8% Triton X-100 (w/v). (\triangle) 0.9% TX-100 (w/v). (\diamond) 1.0% TX-100 (w/v).

indicating that the effective detergent to lipid ratio is still below the l_o -phase saturating one. The results described above are brought together in Fig. 4A (white bars) where one can see that, for detergent amount in the considered range (0.05–0.6% w/v), the $[\text{}^3\text{H}]\text{Chol}$ content of the fractions (1–3) stay more or less constant whereas there is a progressive decrease of the $[\text{}^3\text{H}]\text{Chol}$ content of the fraction four (differences between grey and white bars) corresponding to the medium density structure signal. Above 0.6% TX-100 (w/v), the $[\text{}^3\text{H}]\text{Chol}$ content of the fractions (1–3) and (1–4) are almost identical and decrease till their annulments (Fig. 4A). It can be remarked that this decrease is done without further density shift of the floating fraction structures (Fig. 4C) indicating that a progressive solubilization of the existing floating structures at 0.6% TX-100 (w/v) takes place. The effective saturating detergent to lipid ratio of the l_o phase is now reached.

The totality of the results is summarized in Fig. 5. This figure permits us to emphasize that is possible to find a particular deter-

gent concentration (around 0.6% TX-100 w/v for $300\ \mu\text{M}$ lipid and detergent extraction at $4\ ^\circ\text{C}$) for which only l_o -domains of PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) vesicles are found as TIFFs. However, these domains, almost saturated with TX-100, are obviously not exactly the same than those existing before the detergent treatment.

4. Discussion

The isolation of resistant membrane fraction from a membrane depends on a number of parameters including the nature of the detergent, the temperature, the physical state of the lipid bilayer [23,25]. . . . On the other hand, for a specific detergent, all these parameters can be reduce in one key variable controlling the degree of solubilization: the effective detergent to lipid ratio since the latter depends strongly upon the physical state of the lipid bilayer and as a consequence, of the lipid composition and temperature [24,26,30].

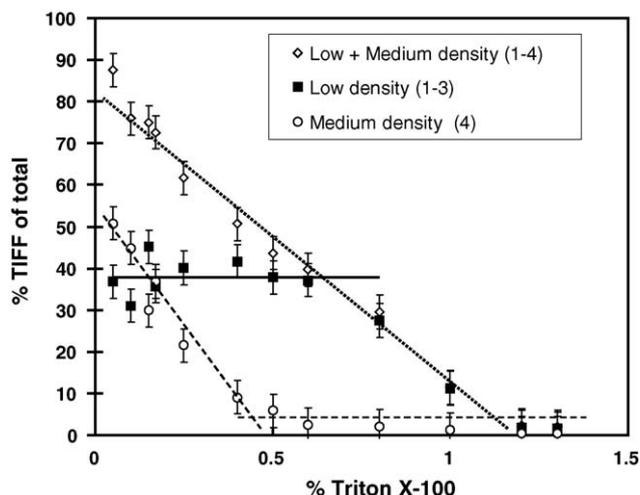
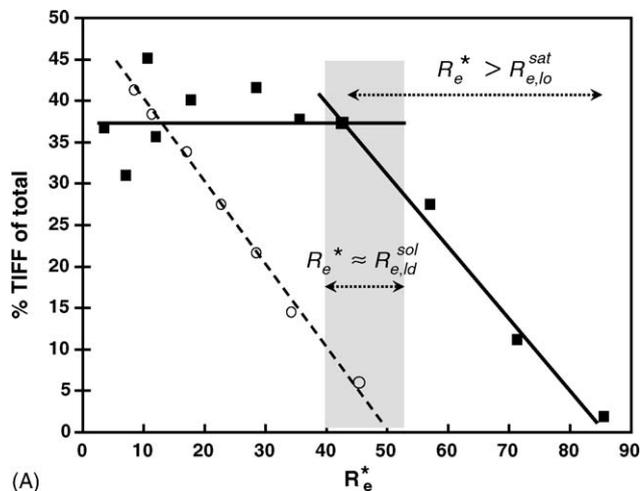


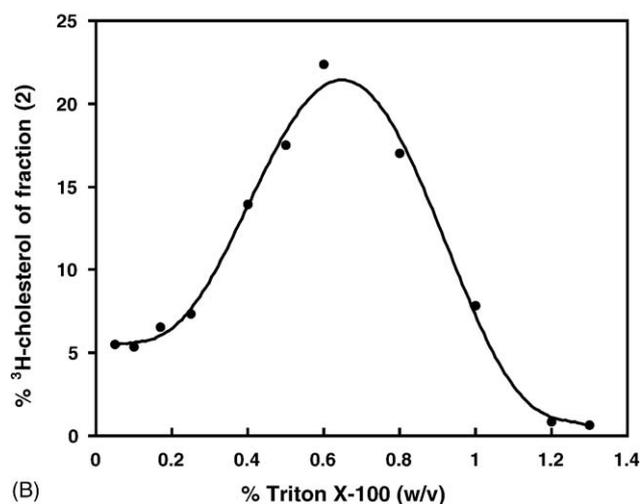
Fig. 5. Percent TIFF of total in the fractions 1–4 (\diamond), 1–3 (\blacksquare) and 4 (\circ) of the sucrose density gradient after treatment of LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol) with Triton X-100 at 4 °C. Error bars represent the standard deviation between two experiments.

Our results show that depending on the effective detergent to lipid ratio, it is possible to obtain partial and complete solubilization of the lipid membranes. Floating fractions resulting from a detergent treatment could be obtained whatever the physical state of the membrane studied here (Figs. 3B and 4A). Nevertheless, our goal is to find floating fractions originating from pre-existing membrane structures, i.e. the l_o domains of the LUVs. So, the key point is to find – if possible – the appropriate effective detergent to lipid ratio permitting this. The existence of such a ratio is under debate because recent results show that TX-100 could promote – or even more induce – the l_o membrane domain formation [22,28,31]. This idea is based on the assumption that ordered and disordered domains in membranes are in equilibrium and that consequently, the modification of the l_d -domains during TX-100 incorporation will also necessarily alter the l_o -domains. However, recent results of our group [25] showed that addition of TX-100 to giant vesicles exhibiting an l_o/l_d phase co-existence induced the l_o -domains to bud and form separate vesicles. Whatever is the structure of disconnected objects for LUVs (vesicles or bicelles), the physical disconnection of the two phases forbid any important l_o -domain composition alteration and thus, allows the existence of such a ratio.

The first idea is that two mechanisms take place simultaneously in the solubilization process of domain-forming LUVs. Below 0.6% TX-100 (w/v), the l_d -phase membrane fraction is solubilized little by little (we are above the effective saturating detergent to lipid ratio of the l_d phase) while the l_o -phase membrane fraction is loaded by TX-100 (we are still below the effective saturating detergent to lipid ratio of the l_o -phase). This is consistent with the increase of the [^3H]Chol content of the non-floating fractions (5–10) (Fig. 4B) and with the density shift toward the low densities of the floating fraction structures (1–4) (Fig. 4B). Around 0.6% TX-100 (w/v), the l_d -phase is now totally solubilized and the effective saturating detergent to lipid ratio of the l_o -phase is reached (no further density shift of the



(A)



(B)

Fig. 6. (A) Percent TIFF of total in fractions (1–3) vs. a particular effective detergent to lipid ratio R_e^* . R_e^* is calculate considering only the lipids that are not in the l_o phase (100% for LUVs PC/SM 2:1, mol/mol and 80% for LUVs PC/SM/Chol 53:27:20, mol/mol). (\blacksquare) LUVs PC/SM/Chol (53:27:20, mol/mol). (\circ) LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol). (B) Percent [^3H]Chol content of fraction (2) vs. percent TX-100 (w/v) for LUVs PC/SM/Chol 53:27:20 (mol/mol).

floating structures, Fig. 4C). Then, above 0.6% TX-100 (w/v), the decrease of the [^3H]Chol content of the floating fractions (Fig. 4C) indicates a progressive solubilization of the existing floating structures. Consequently, we consider that a detergent to lipid ratio around 0.6% TX-100 (w/v) is appropriate to obtain floating fractions coming from pre-existing membrane structures, i.e. TX-100 loaded l_o -domains. Such an explanation is borne out by the representations in Fig. 6A and B. In Fig. 6A, the percent TIFF of total in the fractions (1–3) is plotted according to a particular effective detergent to lipid ratio R_e^* . It should be noted here that the amount of lipid present in the l_o -phase is not consider in order to calculate this particular ratio R_e^* . So, for LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol), all the lipids are taken into account. For heterogeneous LUVs, because the surface fraction covered by the l_o -domains is about 20% of the total (studies involving the fluorescence self-quenching of C₁₂NBD-PC [34]), only 80% of the amount of lipid is considering to calculate this particular effective detergent to lipid ratio (lipids present in the l_d -phase).

Comparatively to Fig. 5 (data ■), this corresponds to a shift of the dotted curve for heterogeneous LUVs (Fig. 6A, data ■) toward higher effective detergent to lipid ratio. Consequently, one can see that the needed detergent content that completely solubilize the LUVs PC/SM 2:1 (mol/mol) correspond more or less to the detergent content needed to begin the solubilization of the floating fractions (1–3) of domain-forming LUVs. This transition occurs around 0.6% TX-100 w/v and this is consistent with our conclusions. Furthermore, one can notice in Fig. 6B that the maximum [³H]Chol content of the fraction (2) is also reached for 0.6% TX-100 (w/v). Further experiments will allow us to determine more precisely this maximum. We expect that the effective detergent to lipid ratio corresponding to the maximum of such a curve may be the appropriate ratio which allows to obtain the TIFF corresponding as much as possible to the l_0 domains existing in the LUV membranes before detergent addition.

We have presented here an ideal scenario which allows us to determine the appropriate effective detergent to lipid ratio which permits the isolation of the l_0 domains of an heterogeneous vesicle. This scenario does not take into account the different and competitive kinetic factors between physical disconnection and possible phase re-equilibration of the l_0 phase domains under the TX-100 interactions.

5. Conclusion

In this paper, we studied the behaviors of lipid membranes upon detergent solubilization. We showed that depending to the TX-100 to lipid ratio, lipid membranes could be partially or totally solubilized. Nevertheless, for lipid bilayers exhibiting l_0/l_d phase co-existence, a particular ratio allowing the isolation of the tightly packed ordered domains existing before the detergent treatment could be found, but, in any case, certain amount of the detergent is presented in floating fraction membranes.

Acknowledgements

We thank Serge Chwetzoff for helpful discussions and Michel Seigneuret for critically reading the manuscript. This work was supported by the CNRS/MR joint programme ACI “Dynamics and Reactivity of Biological Assemblies”.

References

- [1] A. Helenius, K. Simons, Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975) 29–79.
- [2] D. Lichtenberg, R.J. Robson, E.A. Dennis, Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects, *Biochim. Biophys. Acta* 737 (1983) 285–304.
- [3] D.A. Brown, A.E. London, Structure and origin of ordered lipid domain in biological membranes, *J. Membr. Biol.* 164 (1998) 103–114.
- [4] A. Rietveld, K. Simons, The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts, *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998) 467–479.
- [5] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Mol. Cell. Biol.* 1 (2000) 31–41.
- [6] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1998) 569–572.
- [7] P. Sharma, S. Sabharanjak, S. Mayor, Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 13 (2002) 205–214.
- [8] S.N. Ahmed, D.A. Brown, E. London, On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes, *Biochemistry* 36 (1997) 10944–10953.
- [9] M.B. Sankaram, T.E. Thompson, Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin, *Biochemistry* 29 (1990) 10670–10675.
- [10] C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, Lipid rafts reconstituted in model membranes, *Biophys. J.* 80 (2001) 1417–1428.
- [11] R.F. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Shingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophys. J.* 85 (2003) 2406–2416.
- [12] E. London, D.A. Brown, Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid:cholesterol membrane domains (rafts), *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 182–195.
- [13] T.P.W. McMullen, N.A.H. Lewis Ruthven, R.N. McElhaney, Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2004) 459–468.
- [14] S.L. Veatch, S.L. Keller, Organization in lipid membranes containing cholesterol, *Phys. Rev. Lett.* 89 (2002) 268101.
- [15] G. Staneva, M.I. Angelova, K. Koumanov, Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes, *Chem. Phys. Lip.* 129 (2004) 53–62.
- [16] N. Kahya, D.A. Brown, P. Schwill, Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles, *Biochemistry* 44 (2005) 7479–7489.
- [17] N. Puff, A. Lamazière, M. Seigneuret, G. Trugnan, M.I. Angelova, HDLs induce raft domain vanishing in heterogeneous giant vesicles, *Chem. Phys. Lip.* 133 (2005) 195–202.
- [18] M. Edidin, The state of lipid rafts: from model membranes to cells, *Annu. Rev. Biophys. Struct.* 32 (2003) 257–283.
- [19] S. Munro, Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115 (2003) 377–388.
- [20] A. Pralle, P. Keller, E. Florin, K. Simons, J. Horber, Sphingolipid–cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *J. Cell Biol.* 1008 (1998) 997–1008.
- [21] T.P. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, K. Simons, Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 929–942.
- [22] W.K. Subczynski, A. Kusuni, Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single optical microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 (2003) 231–243.
- [23] S. Schuck, M. Honsho, A. Shevchenko, K. Simons, Resistance of cell membranes to different detergents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 5795–5800.
- [24] H. Heerklotz, Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures, *Biophys. J.* 83 (2002) 2693–2701.
- [25] G. Staneva, M. Seigneuret, K. Koumanov, G. Trugnan, M.I. Angelova, Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles. A direct microscopy observation, *Chem. Phys. Lip.* 136 (2005) 55–66.
- [26] J. Sot, M.I. Collado, J.L.R. Arrondo, A. Alonso, F.M. Goñi, Triton X-100 resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon, *Langmuir* 18 (2002) 2828–2835.
- [27] E. Schnitzer, M.M. Kozlov, D. Lichtenberg, The effect of cholesterol on the solubilization of phosphatidylcholine bilayers by the non-ionic surfactant triton X-100, *Chem. Phys. Lip.* 132 (2005) 69–82.
- [28] S. Keller, A. Tsamaloukas, H. Heerklotz, A quantitative model describing the selective solubilization of membrane domains, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 11469–11476.
- [29] D. Lichtenberg, E. Opatowski, M.M. Kozlov, Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 1–19.

- [30] E. Schnitzer, D. Lichtenberg, M.M. Kozlov, Temperature-dependence of the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) by the non-ionic surfactant Triton X-100, kinetic and structural aspects, *Chem. Phys. Lip.* 126 (2003) 55–76.
- [31] H. Heerklotz, H. Szadkowska, T. Anderson, J. Seelig, The sensitivity of lipid domain to small perturbations demonstrated by the effect of triton, *J. Mol. Biol.* 329 (2003) 793–799.
- [32] R.C. MacDonald, R.I. MacDonald, B.P. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L.R. Hu, Small-volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1991) 297–303.
- [33] B.L. Waarts, R. Bittman, J. Wilschut, Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion, *J. Biol. Chem.* 41 (2002) 38141–38147.
- [34] V. Coste, N. Puff, D. Lockau, M.I. Angelova, Probing raft-like nanodomain formation in LUVs by the concentration dependant self-quenching of C12NBD-PC, (2005) *BBA*, in revision.