



HAL
open science

Etude des propriétés interfaciales de l'Apolipoprotéine A-I : caractérisation de son organisation dans les films lipidiques de Langmuir

Lionel Chieze

► **To cite this version:**

Lionel Chieze. Etude des propriétés interfaciales de l'Apolipoprotéine A-I : caractérisation de son organisation dans les films lipidiques de Langmuir. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Rennes 1, 2009. Français. NNT : . tel-03160137

HAL Id: tel-03160137

<https://theses.hal.science/tel-03160137>

Submitted on 5 Mar 2021

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 / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : PHYSIQUE

Ecole doctorale « Sciences de la Matière »

présentée par

Lionel CHIÈZE

préparée à l' Institut de Physique de Rennes.
Unité de recherche UMR UR1 – CNRS 6251.
UFR SPM

Etude des
propriétés interfaciales
de l'Apolipoprotéine A-I :

caractérisation de son
organisation dans les films
lipidiques de Langmuir

Thèse soutenue à
RENNES le 27 / 11 / 2009

devant le jury composé de :

Laurence SALOMÉ
Directrice de Recherche - CNRS
Rapporteuse

Frank LAFONT
Directeur de Recherche - CNRS
Rapporteur

Christian LE GRIMELLEC
Directeur de Recherche - INSERM
Examineur

Sylvie BEAUFILS
Professeur, U.R 1
Directrice de thèse

Véronique VIÉ
Maître de Conférences, U.R 1
Co-directrice de thèse

- REMERCIEMENTS -

Ce travail fut réalisé au sein de l'équipe Biophysique de l'Institut de Physique de Rennes (UMR UR1 – CNRS 6251), dont M^e A. Renault est la directrice et que je remercie de m'avoir accueilli dans son institut. Cette thèse fut réalisée auprès de l'école doctorale "Sciences de la matière" de l'Université de Rennes 1 et financée par la région de Bretagne (gestion CNRS) durant trois années. Un prolongement d'un mois me fut accordé par l'Université de Rennes 1 pour finir ma thèse. Je tiens donc à remercier la région de Bretagne, l'Université de Rennes 1 et le CNRS pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse.

Je remercie les membres de mon jury de thèse et tout d'abord M^e L. Salomé et M^r F. Lafont, qui remplirent tous deux la fonction de rapporteur, puis Mr C. Le Grimellec (président du jury) et Mr V. Bolanos-Garcia (membre invité du jury) qui eurent tous l'amabilité de consacrer une partie de leur temps à lire mon travail de thèse et à en discuter avec moi.

Je remercie du fond du cœur M^e S. Beaufile (direct. thèse) et M^e V. Vié (co-direct. thèse) pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse et pour en avoir assuré la direction durant ces trois années. Je tiens bien sûr à souligner ici la patience, le soutien et la disponibilité dont elles ont fait preuve durant ces trois années, mais aussi leur passion pour la pédagogie et leur profond désir de partager leurs connaissances. En plus de l'ensemble de ses responsabilités (recherche, enseignement, administration...), M^e Beaufile a toujours réussi à exercer parfaitement son rôle de directrice de thèse et je lui en témoigne mes plus vifs remerciements. Je remercie également du fond du cœur M^r V. Bolanos-Garcia (Département de Biochimie de l'Université de Cambridge), qui a initié ce travail sur les protéines à motifs répétés et a effectué l'expression et la purification des apolipoprotéines A-I et A-II dans son laboratoire de Cambridge. Je tiens à souligner ici la disponibilité qu'il m'a accordé, notamment en m'accueillant dans son laboratoire pendant toute une semaine ou en faisant le déplacement depuis Cambridge pour venir écouter ma soutenance de thèse à Rennes.

Je remercie chaleureusement G. Le Caër (Directeur de Recherche CNRS - IPR) qui a réalisé les programmes informatiques m'ayant permis d'analyser la distribution spatiale des particules protéiques sur les images AFM. Je remercie chaleureusement E. Le Rumeur et S. Legardinier, qui ont exprimé et purifié les fragments du domaine central de la dystrophine et avec qui j'ai collaboré sur l'étude des propriétés interfaciales de ces fragments.

Je remercie B. Desbat qui m'aura permis de réaliser des expériences de spectroscopie PM-IRRAS dans son laboratoire (CBMN - Bordeaux). J'exprime également ma gratitude à V.

Burgaud (ex ASI de l'équipe Biophysique) pour la mise en place du dispositif ellipsométrique sur la cuve de Langmuir ainsi qu'à M. Pinot et Y. Qin (ex Master 2R) pour leurs contributions à l'étude des propriétés interfaciales de l'Apo A-I (M. Pinot) et des fragments de la dystrophine (Y. Qin). Naturellement, je tiens aussi à remercier le service administratif de l'IPR (notamment Valérie Ferri), pour l'ensemble du travail impliquant ma personne qui aura été effectué durant ces trois ans.

Je verse une petite larme en remerciant toute la bande de potes du "grand" IPR (comme ça Marie-Emmanuelle tu ne pourras pas dire que je t'ai oublié), qui compte en fait tout ceux qui durant ces trois années m'auront permis de me sentir chez moi dans cette ville, aussi bien au laboratoire que dans la rue Saint-Michel et aussi bien durant la semaine que pendant les week-end (souvent pluvieux). A ce titre, je dis donc un grand merci à Christophe, qui fut en face à face avec moi dans notre bureau pendant trois ans, ainsi qu'à sa copine Yun. Je vous souhaite à tous deux tout le bonheur du monde avec l'heureux évènement qui se prépare et un bon courage pour finir vos thèses, qui ne manqueront pas j'en suis sur, de vous apporter toute la gratification que vous méritez. En ce qui concerne mes collègues de bureau (pièce 002, je précise), je tiens également à remercier Laurent, Estelle et Pascal, avec qui les nombreuses conversations ou éclats de rire que j'ai eu m'ont si souvent amené à faire autre chose que travailler (☺). J'ai aussi une pensée pour Mathieu qui se sera chargé d'organiser pendant longtemps les restos "IPR" durant lesquels on se retrouvait pour faire la fête. Je souhaite une bonne continuation aux nouveaux thésards, qui je le sais, créeront une ambiance aussi sympathique que les anciens (même plus sympathique, les vieux ça fait que parler de l'ancien temps...).

Je voudrais souligner de plus que je fus moniteur auprès de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, durant ces trois années de thèse. Je tiens donc à remercier E. Furet, mon tuteur, ainsi que R. Gautier pour toute leur aide dans cette tâche. Je tiens également à remercier les organisateurs des stages C.I.E.S, qui m'auront permis de trouver une super bande de potes (Carole, Eric, Julie, Nini, Seb et Virg) parmi les thésards de la Physique et des autres disciplines, ce qui fait que globalement, je leur en veut pratiquement pas de m'avoir obligé à participer à ces stages...

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille ainsi que mes amis de Rennes et d'ailleurs (Valence...) pour leur soutien durant toute cette longue période d'étude. Bien sur je remercie du plus profond de mon coeur mes parents, sans qui jamais je ne serais arrivé jusque là.

Communications :

ORALES :

- " *Modélisation des interactions Protéines - Phospholipides à la surface des HDL par des monocouches de Langmuir.*" *RBPGO 4* – Ile de Berder – Juin 2009

Lionel Chièze, Vié V., Le Caër G., Pinot M., Desbat B., Renault A., Bolanos-Garcia V.M and Beaufils S.

- " *Etude de l'adsorption de l'Apolipoprotéine A1 à l'interface liquide/ lipide*"

GEIMM – Colmar – Mai 2008

Lionel Chièze, Véronique Vié , Anne Renault , Victor Bolanos-Garcia et Sylvie Beaufils

AFFICHES :

- " *Etude des propriétés interfaciales de protéines à motifs répétés*"

Journées ChimBIOPhys – Rennes – Décembre 2007.

Lionel Chièze, Vié V., Renault A., Bolanos-Garcia V.M and Beaufils S.

- Glossaire -

TERMES / SYMBOLES	DÉFINITION
BIOLOGIE	
Apo A-I, A-II...	La partie en gras désigne les protéines appartenant à la famille des apolipoprotéines.
R1-3, R4-19 et R20-24	Sous-domaines du domaine central de la dystrophine : R1-3 comprend les répétitions de 1 à 3, R4-19 comprend les répétitions de 4 à 19 et R20-24 comprend les répétitions de 20 à 24.
LPL, LH, LCAT, CETP, SRB1, ABC-1	Désignent respectivement des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol, qui sont les suivantes : Lipoprotéine Lipase (LPL), Lipase Hépatique (LH), Lecithin Cholesteryl Acyl Transferase (LCAT), Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), Scavenger Receptor class B type I (SRB1) ATP-binding Cassette transporter 1 (ABC-1).
VLDL, IDL, LDL, HDL	Désignent respectivement les lipoprotéines de très faible densité (Very Low density), de densité intermédiaire (Intermediate Density), de faible densité (Low Density) et pour finir de haute densité (High Density).
HDL ₂ , HDL ₃	Deux sous-classes associées aux HDL.
DPPC, DOPC, DMPC, DPPG, DOPS	Phospholipides suivants : la dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC), la dioléoyl-phosphatidylcholine (DOPC), la dimyristoyl- phosphatidylcholine (DMPC) le dipalmitoyl-phosphatidylglycérol (DPPG), la dioléoyl-phosphatidylsérine (DOPS).
Phases G, LE, LC et S.	Phases Gazeuse (G), Liquide Expansé (LE), Liquide Condensé (LC) et Solide (S) des phospholipides. Les transitions de phase du premier ordre sont indiquées en désignant les deux phases impliquées dans le changement séparées par /.
<i>trans, tout-trans et gauche</i>	Désignent les conformations des liaisons C-C des chaînes hydrocarbonées des phospholipides.
β -octyl-glucopyranoside	Détergent couramment utilisé pour solubiliser les protéines membranaires.
CE, CL, TG, PL	Ester de cholestérol (CE), cholestérol libre (CL), Triglycéride (TG) et phospholipide (PL).
Motifs 11-mers et 22-mers	Désignent respectivement les motifs de 11 et 22 acides aminés de long des apolipoprotéines échangeables.
INSTRUMENTATION	
Γ_0 μ [mg/m ²], [mN/m]	Désignent respectivement la concentration surfacique nécessaire pour initier une pression de surface non nulle et le coefficient de cisaillement mesuré sur la monocouche formée.
F, A, γ , π [J], [m ²], [mN/m], [mN/m]	Désignent respectivement l'énergie libre, l'aire, la tension et la pression de surface associées à une interface. Les indices i et j, quand ils sont présents, indiquent quels sont les 2 milieux qui forment l'interface.

L, l, e, θ [m], [m], [m], [°]	Désignent respectivement la longueur, la largeur et l'épaisseur du papier filtre et l'angle de mouillage.
P, P_A, F_Z [mN], [mN], [mN]	Désignent respectivement le poids, la poussée d'Archimède et la projection selon l'axe z de la résultante F des forces exercées sur le papier.
$n_{\text{eau}}, n_{\text{air}}, n_1, n_2, \theta_i, \theta_r, \theta_t$ [S.U], [S.U], [S.U], [S.U],[°], [°],[°]	Désignent respectivement les indices de réfraction de l'eau, de l'air ou de milieux quelconques 1 et 2, et les angles d'incidence, de réflexion et de transmission du faisceau laser.
θ_B [°]	Angle de Brewster (rem : $\theta_i = \theta_B - 1$)
$r_p, r_s, \delta_p, \delta_s, (E_{pi}, E_{si}), (E_{pr}, E_{sr})$	Désignent les coefficients de réflexion de l'onde dans le plan parallèle (r_p) et dans le plan perpendiculaire (r_s) au plan d'incidence et les déphasages respectifs δ_p et δ_s , ainsi que les amplitudes du champ électrique E de l'onde incidente (i) et de l'onde réfléchi (r) dans chacun de ces plans.
ψ, Δ, P, A, a [°], [°], [°],[°], [ml/g]	Paramètres ellipsométriques : correspondant au module ψ et à la phase Δ du rapport des coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence. Angles P du polariseur et A de l'analyseur sur le montage expérimental, et incrément a de l'indice de réfraction de la solution.
$\Gamma, \Delta C(z), n$ et h [mg/m ²]	Désignent les paramètres suivants de la monocouche : concentration surfacique à l'équilibre Γ , excès de concentration en fonction de l'éloignement par rapport à l'interface $\Delta C(z)$, indice de réfraction n et épaisseur h .
PM-IRRAS, IRRAS	Polarization Modulation – InfraRed Reflexion - Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS), et Infrared Reflexion - Absorption Spectroscopy (IRRAS)
$f_m, \text{ PEM et } \frac{\Delta R}{R}$ [kHz]	Désignent respectivement la fréquence de modulation, le modulateur photoélastique et le signal de réflectivité différentiel normalisé.
$\mu_i, \psi_{v'}, \psi_{v''}, M_i, E, \theta$	Désignent respectivement l'opérateur moment dipolaire μ_i associé au mode de vibration de la liaison chimique, les états vibrationnels inférieur et supérieur $\psi_{v'}$ et $\psi_{v''}$, le moment de transition M_i qui leur est associé, le champ électrique exciteur E et pour finir l'angle θ entre ce champ électrique et le moment de transition.
RI/RII	Rapport du maximum de l'intensité sur la bande associée à l'amide I sur le maximum de l'intensité sur la bande associée à l'amide II.
AFM, STM, SNOM	Microscopie à force atomique (AFM), microscopie à effet tunnel (STM), microscopie de champ proche optique (SNOM).
$F, k, \Delta z$ [nN], [mN/m], [nm]	Force F exercée par l'échantillon sur la pointe, constante de raideur k du levier et modification de la hauteur de la pointe Δz créée par l'interaction.
P.I.D.	Paramètres du gain du système d'asservissement du microscope AFM : proportionnel P , intégré I et différentiel D .
π_e, π_e^* [mN/m], [mN/m]	Pressions d'exclusion mesurées respectivement par la suppression et par l'augmentation du déphasage provoquées par les protéines dans la couche de lipides.

TRAITEMENT D'IMAGES	
NDG, seuillage	NDG signifie Niveau De Gris, les NDG inférieurs à la valeur seuil prendront la valeur 0 (noir) et ceux qui y sont supérieurs prendront la valeur 255 (blanc) lors du seuillage de l'image AFM.
$D(r)$, $V(r)$, $g(r)$	Probabilité $D(r)$ d'obtenir un objet 1er voisin à une distance r de l'objet étudié. Probabilité $V(r)$ d'obtenir un objet 1 ^{er} voisin à une distance r d'un point distribué au hasard. Pour finir fonction de corrélation sur la position des objets $g(r)$.
ρ	Densité d'objets correspondant à la distribution réelle.
$D_1(r)$, $V(r)$, $g_\delta(r)$	Notations utilisées pour les estimateurs des fonctions $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ respectivement.
ρ^* , f_δ , δ	Paramètres dont dépend l'estimation de $g(r)$: la densité de particules ρ^* d'objets seuillés sur l'image AFM, le noyau d'Epanechnikov f_δ et la bande passante δ .
W , $A()$, et $1_y(x)$	Fonctions mathématiques utilisées pour les estimations des fonctions de distribution : W correspond à une fenêtre délimitant une certaine zone sur la distribution, A représente l'aire de cette fenêtre (ou éventuellement l'aire de l'intersection entre deux fenêtres) et la fonction $1_y(x)$ renvoie 1 si la valeur de x se situe dans l'intervalle y et 0 sinon.
$D(r)_{Exp}$, $V(r)_{Exp}$, $g(r)_{Exp}$	Correspondent aux fonctions de distribution expérimentales mesurées sur l'image AFM.
$D(r)_P$, $D(r)_H$, $V(r)_P$, $V(r)_H$, $g(r)_P$, $g(r)_H$	Correspondent aux fonctions de distribution pour un groupe de points (indice P) ou de disques durs (indice H) distribués aléatoirement sur une surface de la taille de l'image AFM.
$D(r)_{P-LE}$, $D(r)_{H-LE}$, $V(r)_{P-LE}$, $V(r)_{H-LE}$, $g(r)_{P-LE}$, $g(r)_{H-LE}$	Correspondent aux fonctions de distribution pour un groupe de points (indice P-LE) ou de disques durs (indice H-LE) distribués aléatoirement dans des zones circulaires représentant les domaines LE présents sur l'image AFM (DPPC).
$D(r)_{1-5-LE}$, $D(r)_{1-5-LC}$, $V(r)_{1-5-LE}$, $V(r)_{1-5-LC}$, $g(r)_{1-5-LE}$, $g(r)_{1-5-LC}$	Correspondent aux fonctions de distribution pour un groupe de disques durs distribués aléatoirement avec une insertion 5 fois plus probable en phase LE (indice 1-5_LE) ou 5 fois plus probable en phase LC (indice 1-5_LC).
MODÈLE D'AUTO-ASSEMBLAGE	
M , P , MP , MP_n	Désignent la membrane (M), une molécule de protéine (P), un noyau (MP) créé par l'insertion d'une protéine dans la membrane lipidique et pour finir un objet protéique comportant n protéines (MP_n)
C_L , C_P , C_{MP} , C_{MP_n}	Désignent respectivement les concentrations suivantes : concentration en lipides, en protéines, en noyaux et en objets comportant n protéines.
S , S_0 , $P(S)$, α , β , k_1 , k_2 [μm^2], [nm^2], [$S.U.$], μm^{-2} [$S.U.$] [l/mol]	Surface d'un objet protéique S , surface occupée par une protéine S_0 , probabilité $P(S)$ d'obtenir un objet de taille S et paramètres α et β reliant le logarithme de cette probabilité à la surface des objets. Les constantes k_1 et k_2 sont des constantes de réaction respectivement pour la formation des noyaux et pour leur croissance.

Index des tableaux et figures :

LEGENDES	PAGES
Introduction - Figure 1 - Description d'une lipoprotéine de haute densité (HDL).	3
Chap. 1 - Figure 1 - Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés.	9
Chap. 1 - Tableau 1 - Structure de la chaîne latérale R des acides aminés naturels.	11
Chap. 1 - Figure 2 - Classement des acides α -aminés selon l'échelle d'hydrophobicité des chaînes latérales de Kyte et Doolittle (3).	11
Chap. 1 - Figure 3 - Représentation schématique d'une hélice et d'un feuillet β mixte.	14
Chap. 1 - Figure 4 - Représentation des deux isomères L et D des acides aminés.	15
Chap. 1 - Figure 5 - Structure quaternaire de l'hémoglobine.	16
Chap. 1 - Figure 6 - Structure tertiaire de fragments de protéines constitués de différents motifs répétés.	19
Chap. 1 - Figure 7 - Représentation d'un schéma hypothétique concernant l'évolution des gènes des apolipoprotéines échangeables.	21
Chap. 1 - Figure 8 - Classes d'hélices amphiphiles identifiées dans les apolipoprotéines échangeables.	22
Chap. 1 - Figure 9 - Schéma représentant le mode d'interaction des hélices de classe A avec les phospholipides zwitterioniques selon le principe du « snorkel model ».	23
Chap. 1 - Tableau 2 - Comparaison de quelques propriétés physiques des monocouches formées par les apolipoprotéines échangeables à l'interface liquide/air.	24
Chap. 1 - Tableau 3 - Exemples d'acides gras avec leur formule chimique.	26
Chap. 1 - Figure 10 - Formule d'un acide gras.	26
Chap. 1 - Figure 11 - Structure générale d'un diacylphosphoglycéride.	27
Chap. 1 - Figure 12 - Principaux alcools constituant la tête polaire des phosphoglycérides.	28
Chap. 1 - Figure 13 - Structure de la sphingomyéline.	28
Chap. 1 - Tableau 4 - Caractéristiques des principales apolipoprotéines.	29
Chap. 1 - Figure 14 - Structure du cholestérol.	30
Chap. 1 - Tableau 5 - Composition chimique des lipoprotéines.	31
Chap. 1 - Figure 15 - Schéma : HDL sphérique et HDL discoïdal (modèle « Picket-Fence » - modèle « Double-Belt »).	32
Chap. 1 - Figure 16 - Structure cristallographique de l'Apo A-I sans les résidus [1 – 43] et non liée aux lipides.	37
Chap. 1 - Figure 17 - Répartition des motifs et des hélices α amphipathiques (avec leur classe), sur la séquence de l'Apo A-I et localisation des parties liantes et non liantes aux lipides.	38
Chap. 1 - Figure 18 - Structure cristallographique de l'Apo A-I intacte et non liée aux lipides.	40
Chap. 1 - Figure 19 - Modèle en deux étapes pour le mécanisme de liaison de l'Apo A-I à la surface des particules lipidiques sphériques.	40
Chap. 1 - Figure 20 - Structure cristallographique de l'Apo A-II intacte, à l'état pur.	43
Chap. 1 - Figure 21 - Répartition des motifs et des hélices α amphipathiques (avec leur classe), sur la séquence de l'Apo A-II et localisation des parties liantes et non liantes aux lipides.	44
Chap. 2 - Figure 1 - Mode de préparation des films aux interfaces.	50
Chap. 2 - Figure 2 - Représentation schématique des différentes interfaces liquide/air et liquide/lipides.	50
Chap. 2 - Figure 3 - Système à l'équilibre de 3 fluides en contact.	52
Chap. 2 - Figure 4 - Angle de mouillage θ d'une goutte sur une surface solide.	52
Chap. 2 - Figure 5 - Schéma d'une lame de Wilhelmy.	54
Chap. 2 - Figure 6 - Schéma de la réflexion et de la transmission d'un faisceau laser par une interface.	55
Chap. 2 - Figure 7 - Schéma de principe du déphasage d'une onde par une surface de Langmuir.	57
Chap. 2 - Figure 8 - Variations des coefficients de réflexion r_p et r_s en fonction de l'angle d'incidence.	58
Chap. 2 - Figure 9 - Schéma du dispositif expérimental d'ellipsométrie et de tensiométrie sur cuve de Langmuir.	61
Chap. 2 - Figure 10 - Photographie de la cuve de Langmuir.	62
Chap. 2 - Figure 11 - Montage expérimental PM-IRRAS sur cuve de Langmuir.	65

Chap. 2 - Figure 12 - Règles de sélection PM-IRRAS à l'interface liquide/air.	67
Chap. 2 - Figure 13 - Représentation des modes de vibration amide I, II et III.	68
Chap. 2 - Tableau 1 - Fréquences caractéristiques des modes de vibration amide I et II.	69
Chap. 2 - Figure 14 - Spectres simulés d'un film monomoléculaire anisotrope de polypeptides ayant une structure secondaire en hélices α .	70
Chap. 2 - Figure 15 - Graphe de la pression de surface en fonction de la concentration en Apo A-I	71
Chap. 2 - Figure 16 - Mesures de π et Δ en fonction du temps pour les Apo A-I et A-II.	73
Chap. 2 - Figure 17 - Schéma des différentes conformations des chaînes hydrocarbonées.	74
Chap. 2 - Figure 18 - Représentation d'une isotherme de compression.	75
Chap. 2 - Figure 19 - Schéma de principe d'un microscope AFM.	81
Chap. 2 - Figure 20 - Descriptions des leviers et des pointes AFM.	82
Chap. 2 - Figure 21 - Courbe de force en mode contact.	84
Chap. 2 - Figure 22 - Principe de la représentation d'une image AFM.	86
Chap. 2 - Figure 23 - Convolution par la pointe et implication sur la résolution de l'image AFM.	87
Chap. 2 - Figure 24 - Illustration d'un problème provoqué par le traitement post-acquisition.	89
Chap. 2 - Figure 25 - Schéma de principe d'un prélèvement de Langmuir-Blodgett.	90
Chap. 3 - Figure 1 - Graphes π et Δ en fonction du temps pour l'Apo A-I à l'interface liquide/DPPG (pression initiale de 20 mN/m).	97
Chap. 3 - Figure 2 - Graphes de la suppression et de l'augmentation du déphasage provoqués par l'Apo A-I en fonction de la pression initiale dans la couche de lipides (DPPC, DOPC, DPPG).	98
Chap. 3 - Figure 3 - Principe du seuillage d'une image AFM.	101
Chap. 3 - Figure 4 - Principe du seuillage d'une image AFM avec coexistence des phases LE/LC	102
Chap. 3 - Figure 5 - Images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG, pour une pression avant injection de 15 mN/m.	103
Chap. 3 - Figure 6 - Histogrammes normalisés (hauteur, périmètre et surface) des objets pour les couches Apo A-I/phospholipides.	104
Chap. 3 - Figure 7 - Histogrammes normalisés (hauteur, périmètre et surface) des objets pour les couches Apo A-I/phospholipides + correction des hauteurs pour DOPC.	106
Chap. 3 - Figure 8 - Images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG, pour une pression avant injection de 30 mN/m.	108
Chap. 3 - Tableau 1 - Surfaces occupées par les objets sur les couches de phospholipides purs et sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides.	109
Chap. 3 - Tableau 2 - Surfaces occupées par les objets sur les couches de phospholipides purs et sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides (pour une pression de 15 mN/m).	111
Chap. 3 - Figure 9 - Histogrammes normalisés de la hauteur des objets en phase LE pour DPPC pur et pour Apo A-I/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	113
Chap. 3 - Figure 10 - Graphe du logarithme de la probabilité $P(S)$ d'obtenir un objet de surface S , en fonction de S .	116
Chap. 3 - Figure 11 - Spectres PM-IRRAS de l'Apo A-I à l'interface liquide/air.	118
Chap. 3 - Figure 12 - Spectres PM-IRRAS des couches mixtes Apo A-I/DPPC et Apo A-I/DPPG.	119
Chap. 4 - Figure 1 - Principe de l'estimation de $D(r)$.	129
Chap. 4 - Figure 2 - Histogramme de la probabilité $P(D)$ d'obtenir un objet de diamètre D sur les images AFM de couches mixtes Apo A-I/DOPC, avec une pression initiale de 15 mN/m.	132
Chap. 4 - Figure 3 - Image AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) du prélèvement de la couche mixte Apo A-I/DOPC (pression initiale de 15 mN/m).	132
Chap. 4 - Figure 4 - Graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ (expérience, Poisson et disques durs) pour Apo A-I/DOPC (pression initiale de 15 mN/m).	133
Chap. 4 - Figure 5 - Image AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) du prélèvement de la couche mixte Apo A-I/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	135
Chap. 4 - Figure 6 - Graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ (expérience et disques durs) pour Apo A-I/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	136
Chap. 4 - Figure 7 - Graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ pour les objets dans la phase LE de la couche mixte Apo A-I/DPPC (expérience, Poisson et disques durs) (pression initiale de 15 mN/m).	138
Chap. 4 - Figure 8 - Image AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) du prélèvement de la couche mixte Apo A-I/DPPG (pression initiale de 15 mN/m).	140
Chap. 4 - Figure 9 - Graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ (expérience et disques durs) pour Apo A-I/DPPG (pression initiale de 15 mN/m).	141
Chap. 5 - Figure 1 - Séquence de la dystrophine (localisation des répétitions et des domaines de liaison).	149

Chap. 5 - Figure 2 - Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) pour R20-24/PS-PC (1 :1), R1-3/PS-PC (1 :1) et R2/PS-PC (1 :1) (pression initiale de 20 mN/m).	153
Chap. 5 - Figure 3 - Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) pour R20-24/PS-PC (1 :1), R1-3/PS-PC (1 :1) et R2/PS-PC (1 :1) (pression initiale de 30 mN/m).	154
Chap. 5 - Figure 4 - Graphes de la hauteur des objets en fonction de leur surface pour R20-24/PS-PC (1 :1), R1-3/PS-PC (1 :1) et R2/PS-PC (1 :1) (pressions initiales de 20 et 30 mN/m).	155
Chap. 5 - Tableau 1 - Mesures sur les images AFM des couches mixtes protéines (frag. dystrop.) / lipides pour des pressions avant injection de 20 et 30 mN/m.	157
Chap. 5 - Figure 5 - Modèle d'interactions des protéines R2, R1-3 et R20-24.	158
Chap. 5 - Figure 6 - Graphes de la hauteur des objets en fonction de leur surface pour Apo A-I/DPPG et pour Apo A-I/DOPC (pression initiale de 15 mN/m).	160
Chap. 5 - Figure 7 - Graphes π et Δ en fonction du temps pour l'Apo A-II à l'interface liquide/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	163
Chap. 5 - Figure 8 - Images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des prélèvements des couches mixtes Apo A-I/DPPC et Apo A-II/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	164
Chap. 5 - Tableau 2 - Surfaces occupées par les particules sur les couches de DPPC pures et sur les couches mixtes Apo A-I/DPPC et Apo A-II/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	165
Chap. 5 - Figure 9 - Histogrammes normalisés de la hauteur, de la surface et du périmètre des objets en phase LC pour Apo A-I/DPPC et Apo A-II/DPPC à une pression initiale de 15 mN/m.	167
Chap. 5 - Figure 10 - Graphes de la hauteur des objets en fonction de leur surface pour Apo A-I/DPPC et pour Apo A-II/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	169
Chap. 5 - Figure 11 - Histogrammes normalisés de la hauteur des objets en phase LE pour DPPC pur et pour Apo A-II/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	170
Chap. 5 - Figure 12 - Image AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) d'un prélèvement de couche mixte Apo A-II/DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	171
Chap. 5 - Figure 13 - Graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ pour Apo A-II/ DPPC (pression initiale de 15 mN/m).	173
Chap. 5 - Figure 14 - Histogramme de la probabilité $P(D)$ d'obtenir un objet de diamètre D sur les images AFM de la couche mixte Apo A-II/DPPC, avec une pression initiale de 15 mN/m et ajustement de cette distribution par le modèle d'auto-assemblage.	175
Chap. 5 - Figure 15 - Modèle proposé pour l'organisation des Apo C-I et A-II dans une couche de DPPC.	180

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	1
Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique	7
I. Contexte général.....	8
1.1 <i>Les protéines et leur structure</i>	8
1.2 <i>Conséquence de la répétition de fragments de code au sein de la séquence des protéines</i>	17
II. Les apolipoprotéines échangeables.....	20
2.1 <i>Caractéristiques structurales communes des apolipoprotéines échangeables</i>	21
2.2 <i>Caractéristiques communes des monocouches formées par les apolipoprotéines échangeables à l'interface liquide/air</i>	23
III. Les lipoprotéines et le cycle du cholestérol.....	25
3.1 <i>Principales molécules présentes à la surface des lipoprotéines</i>	25
3.2 <i>Composition et structure des lipoprotéines</i>	30
3.3 <i>Métabolisme des lipoprotéines</i>	33
IV. Relation entre structure et fonction pour l'Apo A-I et l'Apo A-II.....	35
4.1 <i>L'apolipoprotéine A-I</i>	35
4.2 <i>L'apolipoprotéine A-II</i>	41

Chapitre 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES - Mesures aux interfaces	49
I. Principe des mesures tensiométriques et ellipsométriques	51
1.1 <i>Mesure de la pression de surface</i>	51
1.2 <i>L'ellipsométrie</i>	55
1.3 <i>Dispositif expérimental</i>	60
II. La spectroscopie PM-IRRAS.....	62
2.1 <i>Principe de la spectroscopie PM-IRRAS</i>	63
2.2 <i>Dispositif expérimental</i>	64
2.3 <i>Règles de sélection à l'interface liquide/air</i>	66
2.4 <i>Spectroscopie infrarouge des protéines</i>	67
III. Matériel biologique.....	71
3.1 <i>Choix des concentrations en Apo A-I et Apo A-II</i>	71
3.2 <i>Choix des lipides</i>	73
3.3 <i>Matériel utilisé</i>	77
IV. La Microscopie à Force Atomique.....	79
4.1 <i>La microscopie à champ proche</i>	79
4.2 <i>Instrumentation</i>	80
4.3 <i>Les modes de fonctionnement</i>	83
4.4 <i>Les images AFM</i>	85
4.5 <i>Préparation des échantillons par la méthode de Langmuir-Blodgett</i>	89

Chapitre 3 – Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l’interaction Apo A-I/phospholipides.....	95
I. Mesures tensiométriques et ellipsométriques.....	95
1.1 <i>L’Apo A-I s’insère dans les monocouches de DPPC, DOPC et DPPG...</i>	95
1.2 <i>Différences d’affinités de l’Apo A-I pour DPPC, DOPC et DPPG.....</i>	96
II. Etudes par AFM des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/phospholipides.....	99
2.1 <i>Méthode pour analyser la forme des pointes créées par la protéine dans la couche de lipide.....</i>	99
2.2 <i>Etude de la forme des particules protéiques dans les couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG.....</i>	103
2.3 <i>Surface occupée par les particules protéiques dans les couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG.....</i>	107
2.4 <i>Approche par un modèle classique d’auto-assemblage.....</i>	113
III. Etudes par spectroscopie PM-IRRAS.....	116
3.1 <i>Etudes de l’Apo A-I à l’interface liquide/air.....</i>	116
3.2 <i>Etudes de l’Apo A-I à l’interface liquide/lipides.....</i>	118
Discussion / Conclusion relatives au chapitre 3.....	120
 Chapitre 4 - Distribution spatiale des particules créées par l’Apo A-I dans la couche de lipides.....	 125
I. Analyse statistique de la distribution spatiale des particules protéiques.....	125
1.1 <i>Les fonctions de distribution.....</i>	125
1.2 <i>Les méthodes d’estimation.....</i>	127
II. Distribution des particules formées par l’Apo A-I sur la couche mixte Apo A-I/DOPC.....	130

III.	Distribution des particules formées par l'Apo A-I sur la couche mixte Apo A-I/DPPC.....	134
	3.1 Etude de l'influence de la coexistence des phases.....	134
	3.2 Analyse de la distribution des particules à l'intérieur des domaines LE....	137
IV.	Distribution des particules formées par l'Apo A-I sur la couche mixte Apo A-I/DPPG.....	139
	Discussion / Conclusion relatives au chapitre 4.....	143
Chapitre 5 - Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.....		147
I.	Comparaison de l'Apo A-I à des fragments de la dystrophine.....	147
	1.1 Présentation de la dystrophine et de ses fragments : R20-24, R1-3 et R2....	148
	1.2 La surface d'occupation et la relation entre hauteur et surface des particules fournissent une information sur la nature de l'interaction.....	151
	1.3 Relation entre hauteur et surface pour les particules créées par l'Apo A-I.....	159
II.	Comparaison de l'Apo A-I à l'Apo A-II.....	162
	2.1 Mise en évidence de l'insertion de l'Apo A-II dans la couche de DPPC....	162
	2.2 Affinités de l'Apo A-I et de l'Apo A-II pour la phase LC de DPPC.....	163
	2.3 Etude de la forme des particules visibles au microscope AFM.....	166
	2.4 Estimation de l'influence de la phase dans DPPC.....	171
	Discussion / Conclusion relatives au chapitre 4.....	176
Conclusion générale.....		183
Annexes.....		

INTRODUCTION GENERALE

Un grand nombre de protéines exercent leurs fonctions biologiques aux interfaces hydrophile/hydrophobe, comme par exemple les protéines interagissant avec les membranes cellulaires. Or, les propriétés physicochimiques des protéines à ces interfaces sont largement impliquées dans leurs fonctions biologiques. Une approche intéressante consiste donc à étudier le comportement de ces protéines à la surface d'une cuve en téflon, nommée aussi cuve de Langmuir. Cette méthode permet d'étudier ces protéines quand elles sont présentes dans différents types d'interface hydrophile/hydrophobe, comme par exemple l'interface liquide/air, lorsque la solution aqueuse remplissant la cuve est exposée à l'air libre, ou l'interface liquide/phospholipides, lorsque nous formons une couche de lipides à la surface de cette cuve. Cette méthode permet également d'utiliser un grand nombre de techniques expérimentales adaptées à la caractérisation de couches minces, dont l'ordre de grandeur correspond à celui des interfaces biologiques : techniques optiques permettant de caractériser la densité du film, mesure de la pression bidimensionnelle (pression de surface) créée par les molécules au sein du film, analyse à l'échelle microscopique par AFM (microscopie à force atomique) d'un prélèvement du film réalisé sur un support solide, spectroscopie infrarouge...

Ainsi, si cette méthode a fait ces preuves pour mettre en évidence des comportements physicochimiques importants des protéines (1, 2), nous allons maintenant tester sa pertinence pour révéler les origines de ces propriétés physicochimiques.

Cette étude s'inscrit dans le contexte général de l'étude des propriétés interfaciales des « protéines à motifs répétés ». Une protéine à motifs répétés comporte dans sa structure une quantité importante de segments analogues, ne comprenant que quelques résidus, et pouvant se retrouver sur d'autres protéines. Si ces segments possèdent des propriétés physicochimiques particulières, il est donc possible qu'un caractère physicochimique particulier de la protéine soit déterminé par le nombre de ces segments dans sa structure. Les études sur les motifs répétés des protéines portent le plus souvent sur l'analyse de la séquence et de la structure des protéines dans lesquels ceux-ci sont localisés (3). La mise en évidence des différences et des similarités dans les propriétés interfaciales des protéines possédant le

Introduction générale

même motif, mais dans des proportions variables, est donc un argument direct pour expliquer les raisons de la conservation, de la délétion ou de la multiplication de ce motif dans la séquence de ces protéines. Cette caractérisation aux interfaces permet également de comparer le degré d'analogie dans les propriétés interfaciales d'un groupe de protéines, au degré d'analogie dans la séquence des motifs. Elle apportera ainsi des réponses à la question suivante : « Quel degré de conservation est nécessaire dans la séquence d'un motif pour conserver ses propriétés interfaciales d'origine ? ». Ce qui en somme revient à se demander quelle est l'information génétique minimale pour conserver une fonction biologique au sein d'une protéine, ou pour permettre à une autre de l'acquérir, dans la mesure où cette propriété biologique dépend des propriétés interfaciales.

Nous nous sommes ainsi intéressés à un groupe de protéines à motifs répétés nommé : « apolipoprotéines échangeables », dont font partie les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E. Les protéines appartenant à ce groupe sont principalement constituées par un grand nombre de répétitions d'un même motif de 11 acides aminés de long (11-mer). Il semble que ce motif ait évolué vers un motif de 22 acides aminés de long (22-mer) présent en proportion variable au sein de ces protéines (4, 5). Les apolipoprotéines échangeables sont présentes à la surface d'assemblages supramoléculaires de taille nanométrique, constitués de protéines et de lipides, et nommés lipoprotéines (voir figure 1). Ces complexes rendent possible le transport de matériaux hydrophobes (acides gras, ester de cholestérol) à travers le plasma sanguin, afin d'alimenter les cellules de l'organisme. La membrane de ces systèmes est le point déterminant de leur structure et de leurs fonctions biologiques. De part son amphiphilicité, elle permet de délimiter le milieu hydrophile du milieu hydrophobe. Du fait de son accessibilité depuis le plasma sanguin, c'est également cette membrane qui présente les sites actifs de la lipoprotéine aux enzymes et autres membranes biologiques. Cette membrane est constituée de lipides, dont la majeure partie sont des phospholipides, et des protéines. Les apolipoprotéines A-I et A-II (Apo A-I et A-II) appartiennent à la famille des apolipoprotéines échangeables, et sont les constituants protéiques majeurs des lipoprotéines de haute densité (HDL). Du fait de leur importance dans le mécanisme inverse du transport du cholestérol et de leur capacité à inhiber ses effets néfastes sur la santé, les HDL ont été étudiées par le passé de façon très intensive (6, 7). Comme les autres protéines de ce groupe, les Apo A-I et A-II auraient la possibilité de se déplacer d'une lipoprotéine à une autre, ce qui laisse supposer que la présence de répétitions du motif 11-mer dans la séquence de ces protéines leur confère des propriétés physicochimiques spécifiques. Cependant, comme toutes ces protéines ne

Introduction générale

possèdent pas la même affinité pour la surface des lipoprotéines (8), il semblerait qu'une divergence dans les propriétés physicochimiques de ces protéines soit créée par la présence en proportion variable du motif 22-mer.

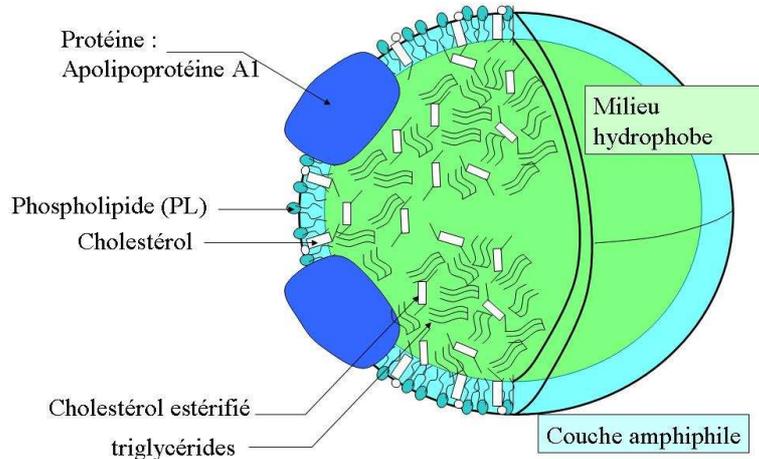


Figure 1 - Description d'une lipoprotéine de haute densité (HDL). Le cœur est hydrophobe (en vert), et la surface est amphiphile (en bleu). Cette surface (ou membrane) est composée de protéines, de phospholipides et de cholestérol.

Des études antérieures sur cuve de Langmuir ont été menées pour caractériser le comportement de l'Apo A-I, de l'Apo A-II et d'autres apolipoprotéines échangeables à l'interface liquide/air (9). Nous avons voulu poursuivre ces études en caractérisant le comportement des Apo A-I et A-II à l'interface liquide/phospholipides. Pour chaque protéine étudiée, nous avons réalisé une couche de phospholipides d'une épaisseur monomoléculaire (monocouche) à la surface de la cuve, et nous avons injecté cette protéine dans la solution aqueuse remplissant la cuve. L'insertion et l'interaction de la protéine avec la couche de phospholipides sont alors mesurées grâce aux techniques décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes – mesures aux interfaces ». Nous avons choisi trois phospholipides différents pour cette étude : DPPC, DOPC et DPPG de manière à étudier l'influence de la charge et de la phase des lipides sur leur interaction avec la protéine. Nos résultats sont divisés en trois chapitres, qui seront suivis de la conclusion générale :

1- *L'influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I / phospholipides.* Nous exposons ici les mesures de la pression de surface et du

déphasage optique (ellipsométrie) produits par la présence de l'Apo A-I dans la couche de lipides. Cette étude est complétée par une analyse statistique par AFM du taux d'occupation des objets créés par la protéine dans ces couches de lipides. Nous exposons également les résultats d'une étude statistique sur la forme des particules protéiques, de taille nanométrique, qui interagissent avec la couche lipidique. Nous avons complété ces résultats par des mesures de spectroscopie infrarouge de type PM-IRRAS.

2- L'analyse de la distribution spatiale des particules créées par l'Apo A-I dans des couches de DPPC, DOPC et DPPG. Cette analyse est nécessaire pour discuter de la différence d'affinité de la protéine entre les phases du lipide dans le cas de la coexistence de ses deux phases. Elle permet également d'étudier les interactions entre ces particules, et d'estimer ainsi leur influence sur l'insertion de la protéine dans la couche.

3- La comparaison entre l'Apo A-I et d'autres protéines du point de vue des affinités pour les lipides. Nous avons ainsi caractérisé par AFM l'interaction entre les fragments du domaine central de la dystrophine et des couches lipidiques de DOPS/DOPC. Le domaine central de la dystrophine est constitué par les répétitions d'un motif de 3 hélices α orientées anti-parallèlement entre elles. En étudiant l'interaction des fragments de ce domaine avec les lipides, nous avons ainsi caractérisé l'interaction protéine – lipides dans le cas d'autres protéines, également constituées d'hélices α comme l'Apo A-I, mais comportant un motif différent qui ressemble à celui de la spectrine. Pour cela, nous avons mesuré les taux d'occupation des objets créés par les fragments de la dystrophine dans la couche de lipides et analysé la forme de ces particules nanométriques. Pour finir, nous avons caractérisé l'interaction de l'Apo A-II avec DPPC en présence de coexistence des phases, par l'ellipsométrie et la mesure de la pression de surface, par les mesures avec l'AFM du taux d'occupation des particules d'Apo A-II dans la couche de lipides et par l'analyse statistique de la forme et de la distribution de ces particules sur les images AFM.

Bibliographie de l'introduction générale

1. Anson M.L., and Edsall J.T. 1952. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 3, p. 95-136. Elsevier.
2. Malmsten M. 2003. *Biopolymers at interfaces, 2nd Edition, Surfactant Science Series. Vol. 110*, p. 415-435 Marcel Dekker, New York.
3. Andrade, M. A., C. Perez-Iratxeta, and C. P. Ponting. 2001. *Protein Repeats: Structures, Functions, and Evolution. Journal of Structural Biology* 134:117-131.
4. Fitch, W. M. 1977. *PHYLOGENIES CONSTRAINED BY THE CROSSOVER PROCESS AS ILLUSTRATED BY HUMAN HEMOGLOBINS AND A THIRTEEN-CYCLE, ELEVEN-AMINO-ACID REPEAT IN HUMAN APOLIPOPROTEIN A-I. Genetics* 86:623-644.
5. McLachlan A. D. 1977. *Repeated helical pattern in apolipoprotein-A-I. 267:465-466.*
6. Phillips, J. C., W. Wriggers, Z. Li, A. Jonas, and K. Schulten. 1997. *Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks. Biophysical Journal* 73:2337-2346.
7. Klon, A. E., J. P. Segrest, and S. C. Harvey. 2002. *Comparative Models for Human Apolipoprotein A-I Bound to Lipid in Discoidal High-Density Lipoprotein Particles Biochemistry* 41:10895-10905.
8. Lagocki, P. A., and A. M. Scanu. 1980. *In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein. Displacement of apolipoprotein A-I from high density lipoprotein by apolipoprotein A-II. J. Biol. Chem.* 255:3701-3706.
9. Bolanos-Garcia, V. M., A. Renault, and S. Beaufils. 2008. *Surface Rheology and Adsorption Kinetics Reveal the Relative Amphiphilicity, Interfacial Activity, and Stability of Human Exchangeable Apolipoproteins. Biophys J.* 94:1735-1745.

Introduction générale

CHAPITRE 1

Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

Nous pouvons trouver dans une protéine ou dans un ensemble de protéines, plusieurs enchaînements d'acides aminés possédant de fortes analogies entre eux. Ces enchaînements se nomment « motifs ». Cette thèse s'inscrit ainsi dans une thématique globale portant sur les propriétés interfaciales d'une catégorie de protéines que l'on nomme « protéines à motifs répétés ».

Nous allons dans un premier temps définir la structure d'une protéine. Celle-ci comporte quatre niveaux. Le passage d'un niveau à un autre consiste à augmenter le nombre d'interactions à prendre en compte entre les segments de protéine. Nous aborderons alors la notion de motif dans la structure des protéines. Ainsi, nous verrons que ces motifs constituent rarement des répétitions identiques d'un ensemble d'acides aminés, mais plutôt la répétition de segments créant une même structure, seuls ou en tandems, et ayant seulement quelques acides aminés en commun, à des endroits clés. De même, nous verrons que si ces motifs ont la particularité d'influer sur la structure des protéines, certains peuvent également jouer un rôle sur leur comportement aux interfaces hydrophile/hydrophobe.

Nous exposerons ici le cas de protéines appartenant à la famille des apolipoprotéines échangeables, qui possèdent toutes dans leur structure une forte proportion d'un même motif amphiphile de 11 acides aminés de long. Ces protéines pour la plupart, possèdent quelques caractères communs à l'interface liquide/air malgré des différences considérables dans leur structure. Cependant, cette interface simple ne révèle pas l'ensemble des similarités et des divergences dans les caractéristiques interfaciales de ces protéines. En effet, les apolipoprotéines ont la particularité d'interagir à la surface de complexes naturels de lipides et de protéines nommés « lipoprotéines ». Sur cette surface, l'interface hydrophile/hydrophobe comporte des phospholipides, qui sont des molécules pouvant créer des interactions de van der Waals, hydrophiles et électrostatiques avec les apolipoprotéines.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

Les apolipoprotéines interviennent à la fois dans le métabolisme et la construction des ces complexes. Nous décrirons ainsi la surface, la composition, la structure et le métabolisme de ces lipoprotéines, notamment pour celles où les protéines étudiées au cours de cette thèse (Apo A-I et Apo A-II) sont impliquées. Pour finir, nous exposerons les résultats concernant la recherche bibliographique autour des relations structure - fonction des Apo A-I et A-II.

I. Contexte Général

1.1 Les protéines et leur structure

1.1.1 La synthèse des protéines

Les protéines sont des macromolécules formées par la liaison de plusieurs acides aminés (ou résidus) entre eux. En général, les protéines sont constituées de plus de 100 acides aminés. En dessous de cette taille, nous parlons de peptides ou de polypeptides. Cependant, certaines considérations interviennent également sur la structure de ces molécules pour déterminer leur classe. Ainsi, les thionines qui ne possèdent que 50 acides aminés sont considérées comme des protéines.

Sur les 500 acides aminés connus à l'heure actuelle, seuls 20 participent à la synthèse des protéines naturelles. Parmi eux, le corps humain en synthétise 12 et les 8 autres sont apportés par l'alimentation. On appelle ces derniers les acides aminés essentiels. Les acides aminés utilisés par le corps humain pour la synthèse des protéines sont des α -aminoacides. Ils sont nommés ainsi, car les trois groupes composant la molécule (voir figure 1) : le groupe acide carboxylique, le groupe amine et la chaîne latérale R sont attachés à un carbone central C_{α} .

La synthèse des protéines a lieu dans un compartiment intracellulaire. Elle comporte trois grandes étapes : la transcription de l'ADN en ARN messager, la traduction de l'ARN messager en peptide et les modifications chimiques co-traductionnelle ou post-traductionnelles de ces protéines (glycosylation, méthylation...). Lors de l'étape de la traduction, les acides aminés vont être assemblés en une chaîne linéaire par la création de

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

liaisons peptidiques entre eux (voir figure 1). Ces liaisons sont obtenues lors d'une réaction chimique entre le groupement carboxyle (COO^-) et le groupement amine (NH^{3+}), qui constituent les deux extrémités d'un acide aminé. La chaîne finale porte donc une charge négative sur son extrémité carboxyle (nommée aussi partie C-terminal) et une charge positive sur son extrémité amine (nommée aussi partie N-terminal). La figure 1 illustre la formation d'une liaison peptidique dans le cas où le pH environnant est neutre.

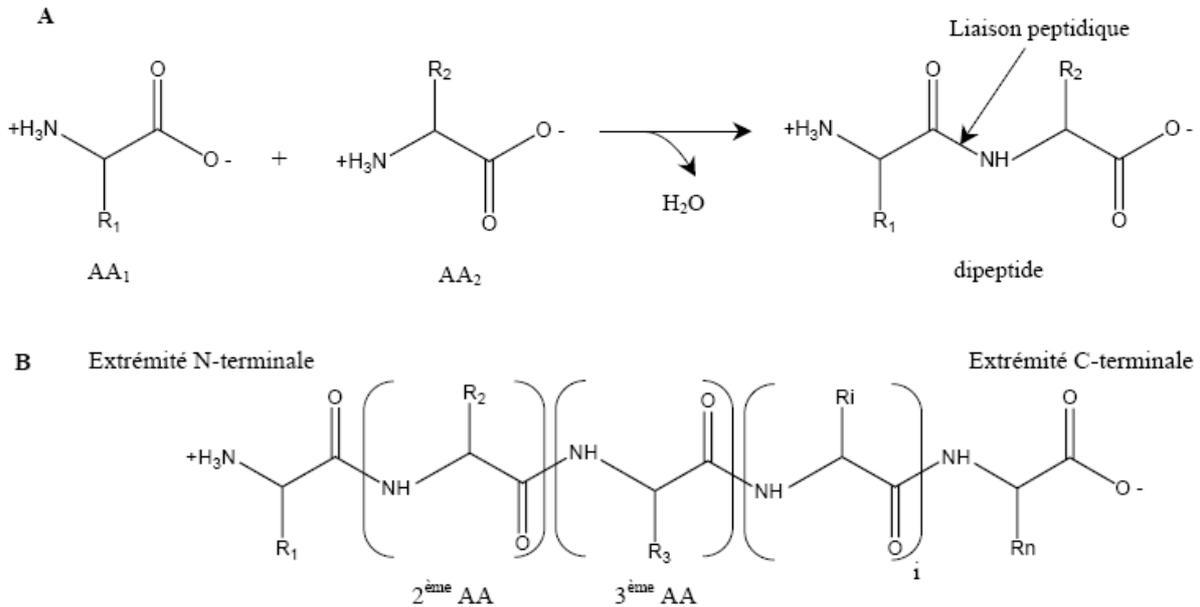


Figure 1 – Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés : le groupement carboxyle et le groupement amine interagissent ensemble, la réaction libère une molécule d'eau (A). Ces liaisons conduisent alors à la formation d'une chaîne linéaire où les extrémités ont une charge opposée (B). Sur ces deux schémas, R_i représente la chaîne latérale associée à l'acide aminé i , C_α : le carbone central, COO^- : le groupement acide carboxylique et NH^{3+} : le groupement amine (1).

Une fois que le peptide formé s'est détaché du ribosome, celui-ci va entreprendre une étape de maturation où il va subir différentes modifications chimiques (modifications post-traductionnelles). Au cours de cette étape, la conformation de la chaîne polypeptidique va être modifiée de manière à obtenir une structure particulière, qui définit également la différence entre la protéine et le peptide. Cette structure est caractérisée selon quatre niveaux qui seront définis dans la suite de ce chapitre.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

1.1.2 Structure des protéines

La structure des protéines est classée selon quatre niveaux. Le premier niveau (structure primaire) correspond à l'ordre dans lequel les acides aminés ont été assemblés tout au long de la chaîne. Trois autres niveaux vont suivre, afin d'obtenir étape par étape la structure tridimensionnelle de la protéine, seule ou auto-associée. L'étude de la structure des protéines appartient au domaine de la biologie structurale et représente un travail essentiel pour comprendre les fonctions biologiques des protéines.

1- La structure primaire

La structure primaire détermine la répartition des résidus le long de la chaîne polypeptidique. La chaîne d'acides aminés étant synthétisée à partir du résidu N-terminal, la séquence est donc écrite à partir de ce résidu, ce qui permet de retrouver l'historique de la construction de cette chaîne. Les 20 aminoacides utilisés pour fabriquer les protéines ne possèdent pas tous des propriétés physico-chimiques similaires. Nous pouvons les regrouper en quatre grandes classes en fonction de la nature de leur chaîne latérale : les résidus aliphatiques, aromatiques, polaires et chargés (voir tableau 1). Ainsi, la répartition des résidus dans la séquence primaire va conditionner le repliement de la protéine du fait de leurs propriétés physico-chimiques spécifiques. En effet, la protéine va se configurer dans une organisation tridimensionnelle particulière, afin de regrouper ses résidus en fonction de leurs caractères. Cependant, au sein d'une même classe, il existe des différences sensibles entre les propriétés physico-chimiques des différents résidus (voir figure 2), ce qui peut rendre difficile la détermination de l'organisation spatiale des acides aminés en fonction de la séquence primaire. L'encombrement stérique est également un facteur qui devra être pris en compte pour comprendre le repliement de cette chaîne, car les chaînes latérales des résidus n'occupent pas toutes la même place.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

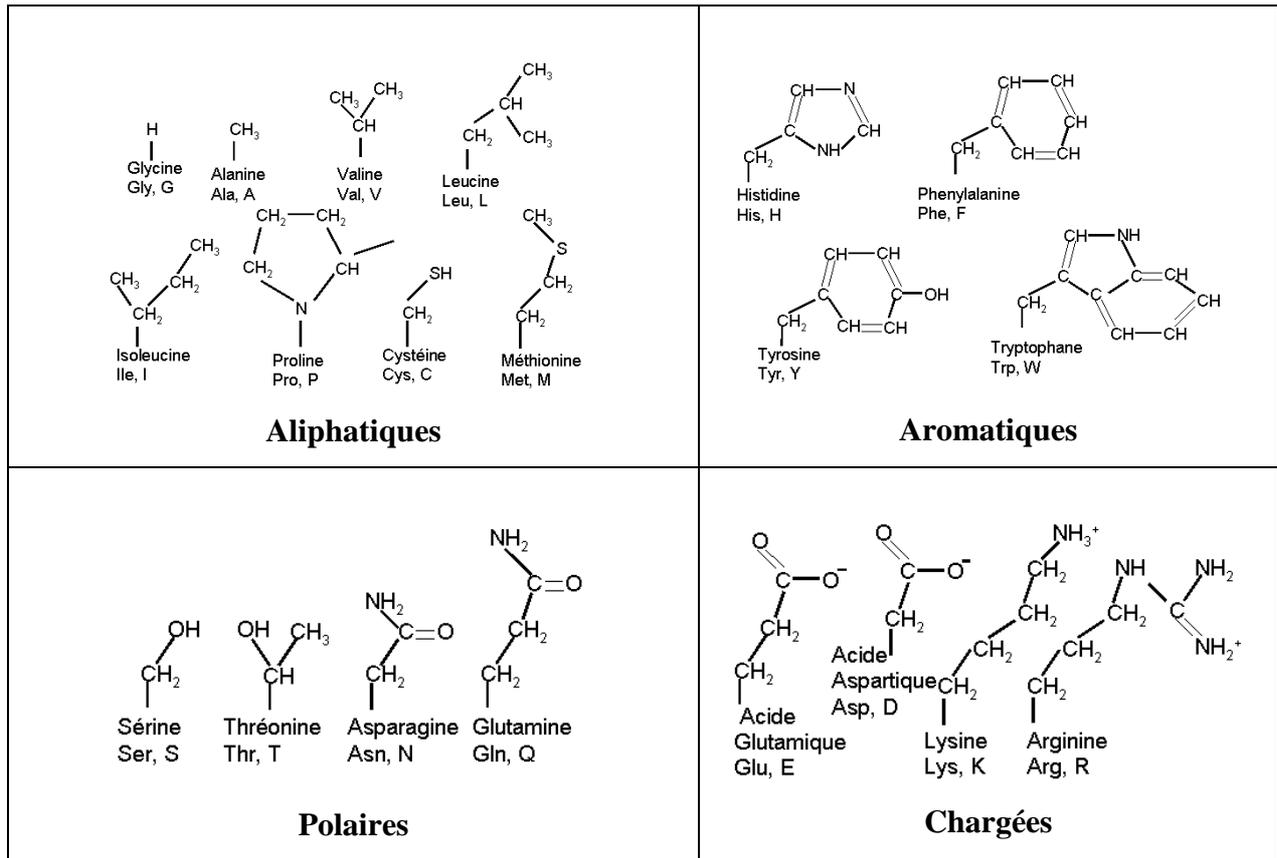


Tableau 1 – Structure de la chaîne latérale R des acides aminés naturels. Pour le cas de la Proline, la chaîne latérale est à la fois rattachée au groupement carboxyle et au groupement amine. On dénombre quatre grands groupes de chaînes : aliphatiques, aromatiques, polaires et chargées (2).

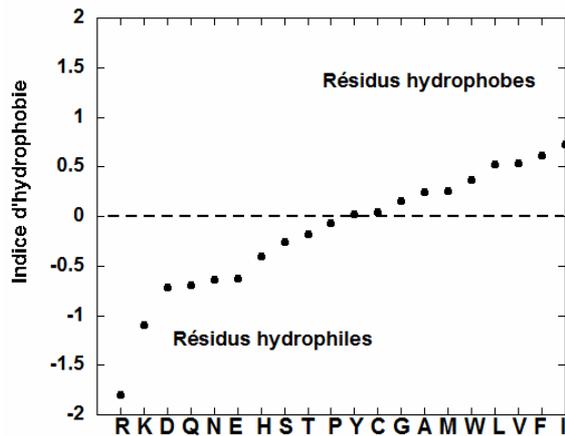


Figure 2 – Classement des acides α -aminés selon l'échelle d'hydrophobicité des chaînes latérales de Kyte et Doolittle (3).

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

2- La structure secondaire

Après avoir créé une chaîne linéaire par la formation de liaisons peptidiques, les acides aminés vont interagir entre eux en établissant des liaisons non covalentes (liaisons hydrogène), qui vont conduire à une organisation spatiale particulière. Afin de déterminer cette organisation, une première approche consiste à ne considérer que les interactions locales présentes sur les segments de la protéine. La structure des différents segments de la protéine ainsi établie se nomme structure secondaire.

Les acides aminés ont la particularité de posséder des groupements hydrophiles (amine et carboxyle). Ces groupements, enfouis à l'intérieur de la protéine, vont devoir créer des liaisons hydrogène entre eux. L'établissement de telles liaisons, entre des groupes qui interviennent de façon périodique sur la chaîne, engendre alors une périodicité dans l'organisation spatiale des résidus. Deux structures périodiques furent proposées en 1951 par Pauling et Corey : les hélices α et les feuillets β (4). L'obtention d'une structure plutôt qu'une autre ne dépend évidemment que de la nature des chaînes latérales des résidus et de l'ordre dans lesquels ceux-ci sont rangés dans la séquence primaire. D'autres structures non périodiques ont également été mises en évidence par la suite, comme le coude β et la boucle Ω .

Dans une structure en hélice α , la chaîne principale se replie sur elle-même, à l'intérieur de l'édifice, de manière à rapprocher le groupement carboxyle d'un résidu du groupement amine d'un autre résidu, en créant ainsi des liaisons hydrogène parallèles à l'axe de l'hélice. Dans le cas général, les liaisons hydrogène se créent entre le groupe CO du résidu n et le groupe NH du résidu $n+4$. Chaque résidu augmente la longueur de l'hélice de 1.5 Å et il faut environ 3.6 résidus (entre 3.5 et 3.7) pour construire un nouveau pas sur l'hélice, ce qui correspond à un changement d'orientation de 100° entre les chaînes latérales de deux résidus successifs (voir figure 3). Il existe également d'autres types de structures en hélice chez les protéines telles que les hélices 3_{10} pour lesquelles chaque pas de l'hélice compte 3 résidus ou des superhélices. Dans une configuration en hélice α , les chaînes latérales sont orientées vers l'extérieur de l'hélice et leur orientation est alors définie par le pas de l'hélice. Ainsi, des chaînes qui sont espacées d'une longueur correspondant à ce pas, seront à proximité l'une de l'autre, et devront avoir des caractères physico-chimiques qui permettent leur coexistence. Les hélices possèdent presque toujours une configuration « droite » (par opposition à « gauche »). Cette configuration provient de la chiralité des acides aminés. Les acides aminés sont des molécules chirales, à l'exception de la glycine, et existent donc sous deux formes différentes :

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

deux isomères, qui correspondent à une organisation spécifique des groupements chimiques autour du carbone central, telle que chaque isomère soit la projection symétrique de l'autre par rapport à un plan (voir figure 4). Seuls les acides aminés L sont utilisés pour constituer les protéines.

Pour une structure en feuillets β , les groupements hydrophiles ne créent plus de liaisons hydrogène entre des résidus localement proches sur la chaîne, mais entre des résidus situés sur des segments de protéines différents (on dit aussi chaînes différentes ou brins différents) (voir figure 3). Ainsi, dans cette configuration la chaîne principale n'est pas enroulée sur elle-même, comme dans le cas d'une hélice, mais étirée. Le long de la chaîne, deux résidus successifs sont approximativement espacés de 3.5 Å et leurs chaînes latérales sont dirigées dans des directions opposées. Les deux brins qui constituent un feuillet β peuvent avoir des chaînes principales qui sont parallèles ou anti-parallèles. Dans le cas des chaînes parallèles, le résidu le plus proche de l'extrémité C-terminal sur un brin se situe en face de son homologue sur l'autre brin (et réciproquement pour le résidu le plus proche de l'extrémité N-terminal). Par contre, dans le cas des chaînes anti-parallèles, le résidu le plus proche de la partie C-terminal (réciproquement le résidu le plus proche de la partie N-terminal) sur l'un des brins est en face du résidu le plus proche de la partie N-terminal sur l'autre brin (réciproquement le résidu le plus proche de la partie C-terminal).

Entre ces deux configurations, les liaisons hydrogène ne s'établissent pas de la même manière. Sur la figure 3, nous voyons un feuillet mixte avec trois brins constituant un arrangement parallèle et un arrangement anti-parallèle. Sur le brin le plus à gauche, disposé parallèlement par rapport au brin central, nous constatons d'une part, que seul un résidu sur deux interagit avec le brin voisin, et d'autre part, que pour chaque résidu créant des liaisons hydrogène, CO interagit avec le groupe NH du résidu situé un pas après sur la chaîne centrale, tandis que NH interagit avec le groupe CO du résidu situé un pas avant sur la chaîne centrale. Pour ce qui est du brin le plus à droite, celui-ci crée un arrangement anti-parallèle avec le brin central. Nous constatons toujours que seul un résidu sur deux interagit avec la chaîne centrale, mais pour chaque résidu impliqué dans cette interaction CO (réciproquement NH) est associé au groupe NH (réciproquement CO) du résidu voisin sur la chaîne centrale. Ainsi, tous les groupes CO et NH de la chaîne impliquée dans les deux arrangements créent des liaisons hydrogène, ce qui permet de la stabiliser fortement.

La structure secondaire de la protéine peut être obtenue par spectroscopie infrarouge. Cette méthode permet de comparer les proportions en hélices α , feuillets β parallèles ou antiparallèles et boucles dans la structure de la protéine. Elle peut également donner une

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

estimation de la proportion de résidus dans les segments de protéines désorganisés (sans structure particulière). Certaines des spectroscopies infrarouges, comme la spectroscopie PM-IRRAS, permettent également d'avoir accès à l'orientation des segments de la protéine (dans le cas où la protéine est adsorbée à l'interface liquide/air sur une cuve de Langmuir). Cette spectroscopie est exposée plus en détails au chapitre 2, section 2.

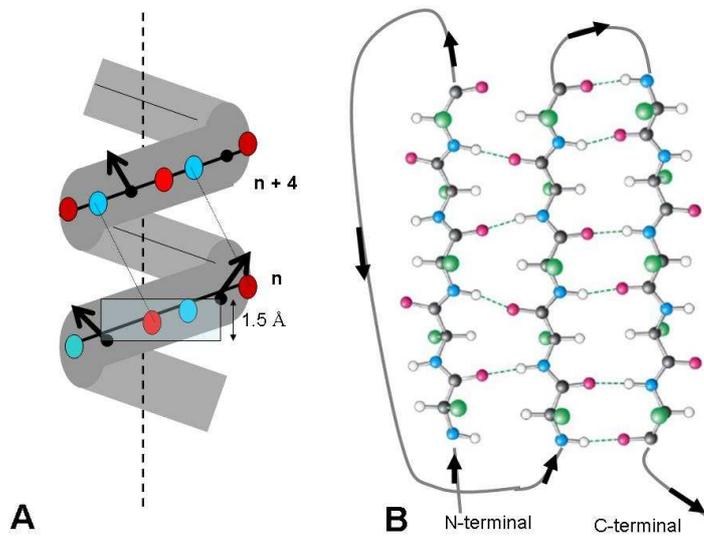


Figure 3 – (A) Représentation schématique d'une hélice α : groupes CO (rouge), groupes NH (bleu), C_{α} (points noirs) et chaînes latérales (flèches noires). L'hélice s'allonge de 1.5 Å pour chaque résidu et sa structure repose sur les liaisons hydrogène créées entre CO d'un résidu n et NH d'un résidu $n+4$. (B) Représentation schématique d'un feuillet β mixte : le brin de gauche et le brin central forment un feuillet parallèle, tandis que le brin central et le brin de droite forment un feuillet anti-parallèle (5). Le trait gris représente la chaîne polypeptidique et les flèches noires indiquent le sens de la chaîne. Sur les feuillets, nous voyons : oxygène (rouge), azote (bleu), carbone (noir) et chaînes latérales (sphères vertes). Les traits en pointillé représentent les liaisons hydrogène.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

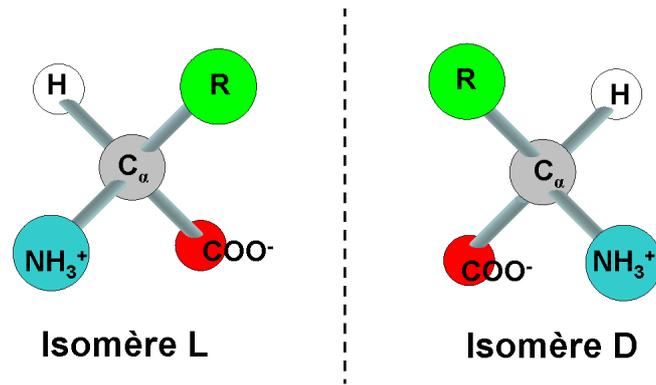


Figure 4 – Représentation des deux isomères L et D des acides aminés. Ces deux molécules sont symétriques par rapport au plan représenté par le trait en pointillé.

3- La structure tertiaire

La structure tertiaire correspond à la configuration des acides aminés dans l'espace tridimensionnel en tenant compte de l'ensemble des interactions existantes. Ainsi, en plus des liaisons hydrogène déjà évoquées, les résidus interagissent par des interactions de van der Waals et des liaisons disulfures (liaison covalente forte établie entre deux résidus cystéine). La structure tertiaire permet de déterminer la classe à laquelle la protéine appartient, du fait de sa fonction biologique. Par exemple, les protéines globulaires, qui sont des protéines solubles en milieu aqueux, adoptent une structure qui leur permet de placer leurs segments hydrophobes à l'intérieur de l'édifice moléculaire, loin du milieu aqueux. En revanche, les protéines membranaires ont une structure qui leur permet de placer ces segments hydrophobes à l'intérieur de la bicouche lipidique. La structure tertiaire des protéines est obtenue, soit par des études cristallographiques de diffraction des rayons X, soit en utilisant la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.

De nombreux facteurs modulent la conformation de la protéine : solvant, force ionique, viscosité, concentration en protéines. Ainsi, la structure tertiaire est très dépendante des conditions expérimentales dans lesquelles elle a été obtenue. D'autres informations seront ainsi nécessaires pour connaître la structure de la protéine dans son contexte biologique.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

4- La structure quaternaire

Les protéines dans leur environnement biologique sont parfois auto-assemblées. Par exemple, l'hémoglobine est constituée de quatre chaînes polypeptidiques de même structure tertiaire (voir figure 5). La structure quaternaire représente ces auto-assemblages de protéines. Ces structures sont stabilisées par des liaisons hydrogène, des ponts disulfures, et des ponts salins (liaisons ioniques créées entre les groupes NH^{3+} et COO^- situés aux extrémités des chaînes).

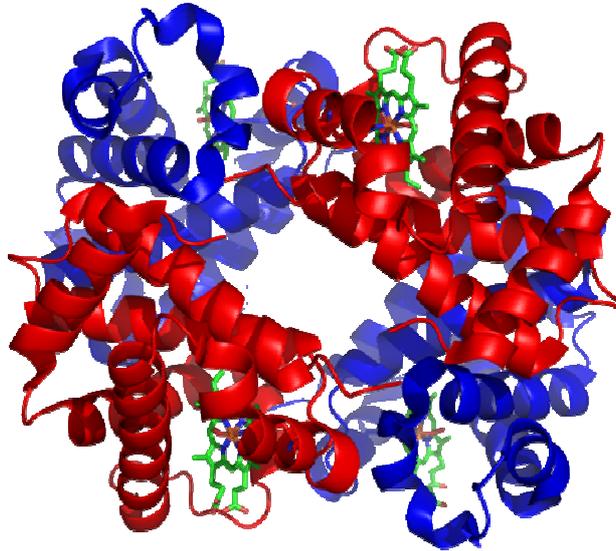


Figure 5 - Structure quaternaire de l'hémoglobine. Ce tétramère est constitué de deux dimères (α,β) identiques. Les monomères en bleu représentent la forme α et ceux en rouge représentent la forme β (6).

1.2 Conséquence de la répétition de fragments de code au sein de la séquence des protéines

1.2.1 Les protéines possèdent dans leur séquence une proportion importante de motifs pouvant se répéter d'une protéine à l'autre et d'une espèce à l'autre

La plupart des innovations dans la fonction des protéines sont survenues par l'intermédiaire de la duplication des gènes (7). La duplication et la recombinaison à l'intérieur d'un gène sont souvent responsables de fortes similarités dans les séquences codées par des régions distinctes de ce gène (8). Ces similarités sont appelées « motifs répétés » et sont fréquentes, elles apparaissent dans au moins 14% de l'ensemble des protéines (9).

Des études ont montré que des répétitions du motif HEAT (voir figure 6), ayant été observées sur différentes espèces, n'étaient en moyenne identiques qu'à 13% au niveau de leur séquence (10). Ceci indique que malgré la conservation de la structure globale créée par ces sous-unités, seule une faible contrainte fut exercée sur la conservation de chaque répétition. Ainsi, du fait de la faible similarité des répétitions de certains motifs, au sein de la séquence d'une protéine et entre les séquences de différentes protéines, la détection de ces motifs est difficile. Cette détection est rendue encore plus ardue par le fait que le nombre de répétitions n'est pas forcément un multiple entier. Ainsi, déterminer l'existence de régions répétitives au sein d'une séquence nécessite de prendre en compte à la fois les alignements optimaux, correspondant aux motifs pour lesquels le score est le plus élevé et les alignements sub-optimaux, qui correspondent aux motifs dont le score est moins élevé. La pertinence de l'alignement peut ensuite être estimée à partir d'une approche classique, qui consiste à comparer le score obtenu pour un motif à celui obtenu sur des séquences reconstruites en générant aléatoirement la position des résidus (11). La pertinence de ce score peut également être estimée à partir des résultats obtenus sur des protéines appartenant à d'autres espèces.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

1.2.2 Certains motifs conditionnent la structure tridimensionnelle de la protéine ainsi que ses propriétés physico-chimiques

Certains motifs, comme par exemple : TPR, Armadillo/HEAT, ANKYRIN et LRR... vont apparaître sous la forme de tandem au sein d'une séquence et former un assemblage doté d'une structure tridimensionnelle particulière (8) (voir figure 6). Ainsi la détection de ces motifs dans les séquences des protéines produit des informations qui sont à la fois importantes pour la structure, la fonction et l'évolution de ces protéines.

La répétition de petites unités structurales offrent certains avantages à la protéine que ne permet pas la répétition de domaines de taille plus importante (8). Ainsi, la répétition de certains motifs permet la création de structures ouvertes dont le nombre de répétitions peut ne pas être limité par l'encombrement stérique (c'est le cas par exemple du motif HEAT). D'autres ont la possibilité, au contraire, de créer des structures très compactes permettant de limiter l'interaction avec les ligands (c'est le cas par exemple du motif Kelch).

Les motifs répétés sont le plus souvent impliqués dans les liaisons opérées par la protéine (8). Ceci montre l'importance de la caractérisation de ces motifs répétés aux interfaces hydrophile/hydrophobe, qu'ils soient à l'état isolé ou à l'intérieur de la protéine. Ainsi, certaines études ont démontré que les motifs TPR présents dans différentes protéines possédaient des propriétés interfaciales semblables (cinétique d'adsorption, activité de surface, stabilité et rhéologie de surface), malgré un taux de conservation assez faible dans la séquence de leurs acides aminés (12). Ceci indique que la répétition de certains motifs peut créer des propriétés interfaciales particulières associées à une structure tertiaire bien déterminée, même si la quantité de résidus conservés au sein de la séquence est faible. D'autres études ont été réalisées sur des protéines entières, appartenant à la famille des apolipoprotéines échangeables et possédant toutes un certain nombre de répétitions d'un même motif, mais ayant des structures tertiaires différentes. Ces études sont exposées plus en détail dans la section 2.2 de ce chapitre. Ces travaux montrent que ces protéines possèdent une activité de surface similaire (pression de surface et quantité de matière à l'interface pour l'équilibre thermodynamique) (13). Ainsi, la répétition d'un motif amphiphile de 11 acides aminés de long dans la séquence a permis de conserver chez ces protéines certaines propriétés identiques aux interfaces hydrophile/hydrophobe, tout en permettant à leur structure d'évoluer pour accomplir d'autres fonctions. Pour finir, ces résultats peuvent être rapprochés d'une étude qui a démontré que la fréquence d'apparition des motifs répétés est plus importante

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

dans les organismes eucaryotes que dans les organismes procaryotes (9), ce qui laisse entendre que ces sous unités sont associées à l'augmentation de la complexité des fonctions cellulaires (8).

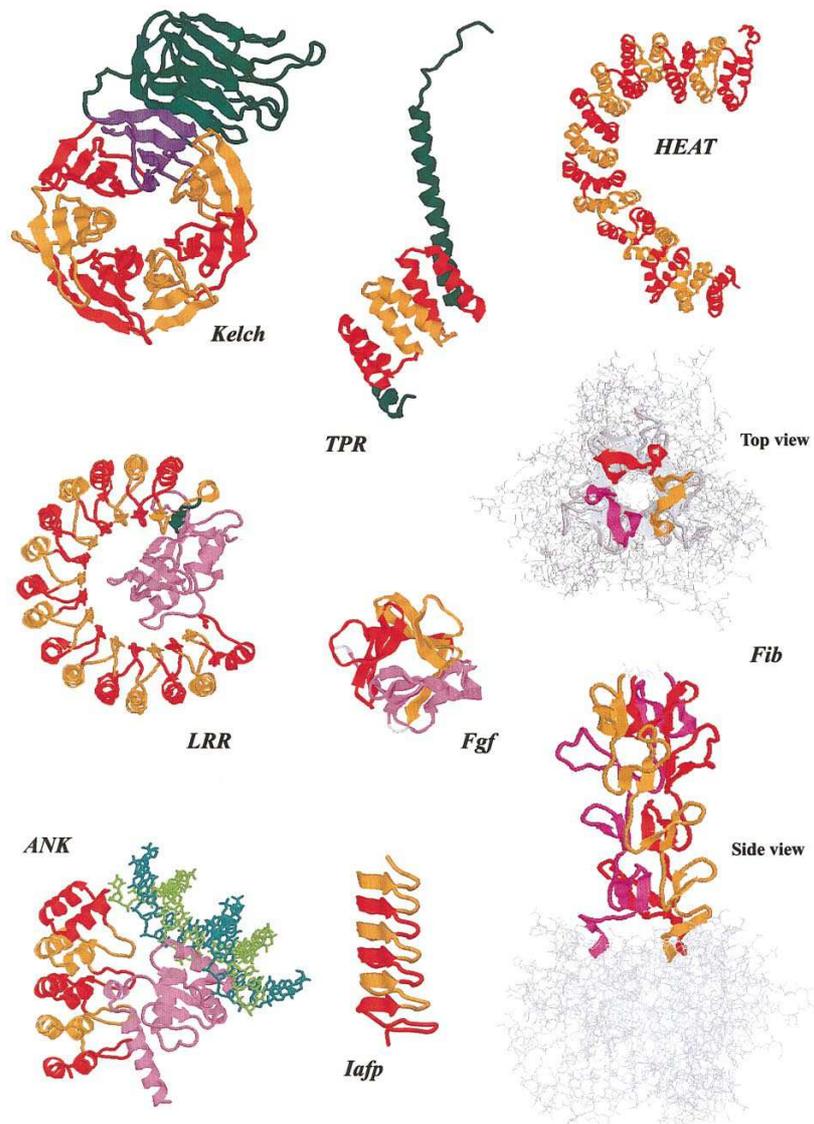


Figure 6 – Structure tertiaire de fragments de protéines constitués de différents motifs répétés (les noms de ces motifs sont indiqués sur la figure). La délimitation entre chaque motif est indiquée par un changement de couleur (8).

II. Les apolipoprotéines échangeables

Cette thèse aborde la question de l'influence des motifs répétés sur les propriétés interfaciales des protéines, à travers l'étude de l'Apo A-I et dans une moindre mesure celle de l'Apo A-II, qui sont deux protéines appartenant à la famille des « apolipoprotéines échangeables ». Les apolipoprotéines interviennent dans des complexes formés de lipides et de protéines, nommés « lipoprotéines », qui permettent de véhiculer les lipides hydrophobes à travers le plasma sanguin. Les différentes classes de lipoprotéines ainsi que leur structure et leur métabolisme seront décrites dans la section 3. Les apolipoprotéines échangeables sont un sous-groupe de la famille des apolipoprotéines. Les membres de ce sous-groupe ont la possibilité de se déplacer d'une lipoprotéine à une autre, contrairement aux autres membres de cette famille qui restent liés au complexe moléculaire durant tout son parcours métabolique. Ce sous-groupe compte sept protéines : Apo A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E, qui possèdent un nombre important de similarités entre elles.

2.1 Caractéristiques structurales communes des apolipoprotéines échangeables

Les apolipoprotéines échangeables ont en commun des similarités au niveau de leurs gènes, qui pour plusieurs d'entre eux sont localement proches dans le génome. Ces gènes possèdent tous quatre exons (séquences traduites lors de la synthèse la protéine) et trois introns (séquences non traduites situées entre les exons), à l'exception du gène de l'Apo A-IV qui possède trois exons et deux introns (14). Les deux premiers exons codent le peptide signal tandis que les exons 3 et 4 codent la protéine finale. Ces protéines possèdent également des similarités au niveau de leurs structures, chacune d'elles possède dans sa séquence plusieurs répétitions d'un même motif de 11 acides aminés de long, nommé motif 11-mer (15). Ce motif a évolué pour former un autre motif de 22 acides aminés de long, nommé motif 22-mer, que l'on retrouve également dans la séquence de ce groupe d'apolipoprotéines. Les répétitions de ce motif 22-mer ont souvent la périodicité d'une hélice α , et beaucoup d'entre elles admettent une proline au niveau du premier résidu, ce qui a pour effet de créer des « coudes »

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

séparant les hélices. Ce motif 22-mer est principalement codé par l'exon 4 (ou l'exon 3 pour l'Apo A-IV). La longueur de cet exon varie considérablement entre les protéines de cette famille, en comparaison à l'exon 3 (ou l'exon 2 pour l'Apo A-IV), ce qui produit une variation importante du nombre de motifs 22-mer présents dans les séquences de ces protéines (de 1 répétition pour l'Apo C-II à 13 répétitions pour l'Apo A-IV). En se basant sur leur degré d'homologie, un arbre d'évolution a été proposé pour les apolipoprotéines échangeables (14) (voir figure 7). Celui-ci annonce que toute cette famille est issue d'un même gène probablement proche de l'Apo C-I.

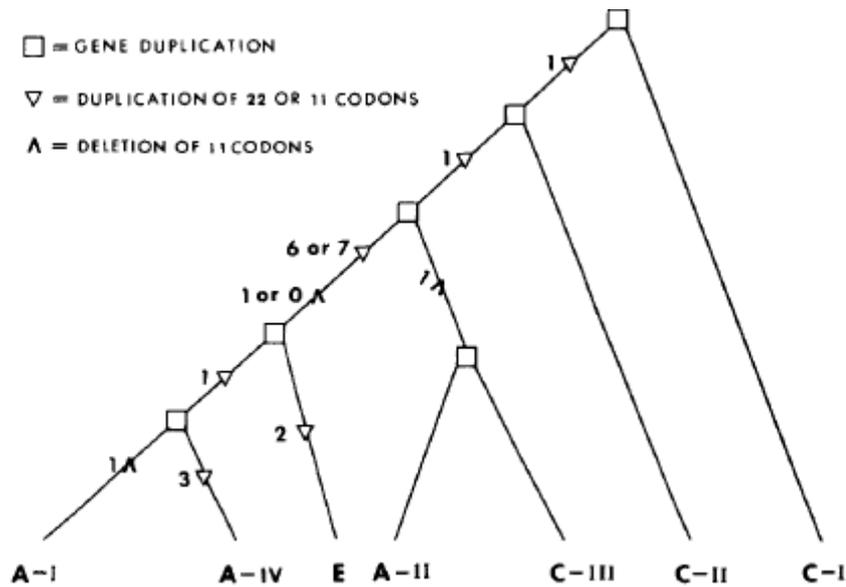


Figure 7 - Représentation d'un schéma hypothétique concernant l'évolution des gènes des apolipoprotéines échangeables. L'ancêtre commun est proche de l'Apo C-I. Chaque carré correspond à la duplication d'un gène. Les deux copies vont ensuite évoluer indépendamment l'une de l'autre en subissant une ou plusieurs duplications ou délétions d'un motif 11-mer ou 22-mer (14).

Les apolipoprotéines échangeables possèdent des hélices α amphiphiles, qui leur permettent de s'associer avec les lipides. Cependant, il existe plusieurs classes d'hélices α , chez ces protéines, qui n'ont pas toutes la même affinité pour les lipides (16). Ces classes d'hélices se nomment A, G* et Y (voir figure 8).

Les hélices de classe A correspondent à une catégorie d'hélices propre aux apolipoprotéines échangeables, où les acides aminés chargés positivement (l'arginine et la

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

lysine) sont placés à l'interface entre la région polaire et non polaire, tandis que les acides aminés chargés négativement (l'acide glutamique et l'acide aspartique) sont placés au centre de la région polaire. Cette configuration a été associée à la présence des motifs 22-mer (17). Elle privilégie les interactions entre l'Apo A-I et les phospholipides (notamment ceux qui sont zwitterioniques), en insérant les hélices dans la monocouche de lipides parallèlement à l'interface hydrophile/hydrophobe (voir figure 9). Dans cette configuration, nommée également « snorkel model » (modèle du tuba), les résidus placés à l'interface hydrophile / hydrophobe s'étendent vers la face polaire de l'hélice de façon à placer leurs charges positives dans le milieu aqueux (18), ce qui permet à l'hélice de dissimuler la totalité de sa face non polaire dans la partie hydrophobe de la couche de lipides.

Les hélices de classe G* se rencontrent dans cinq des sept apolipoprotéines échangeables. Ces hélices amphiphiles sont caractérisées par la distribution aléatoire des acides aminés de charges positives et négatives sur leur face polaire. Cette classe ressemble beaucoup aux hélices amphiphiles G, présentes dans les protéines globulaires, qui du fait d'un large secteur polaire sont très solubles et présentent peu d'affinité pour les lipides. Cependant les fonctions biologiques des hélices de classe G* sont, elles, moins bien connues.

Les hélices de classe Y, ont également une distribution spécifique des acides aminés chargés. Ceux-ci se regroupent en différents domaines en fonction de leur charge. Les résidus positifs se situent au centre de la partie polaire et à l'interface entre les parties hydrophile et hydrophobe, tandis que les résidus négatifs se situent sur la face polaire entre les groupes de résidus positifs. Les fonctions biologiques de cette classe d'hélices sont également encore mal connues.



Figure 8 – Classes d'hélices amphiphiles identifiées dans les apolipoprotéines échangeables. Elles sont caractérisées par la distribution des résidus chargés et par les tailles des secteurs occupés par les résidus hydrophobes et hydrophiles – secteurs noirs : résidus polaires positifs, secteurs hachurés : résidus polaires négatifs et secteurs blancs : résidus hydrophobes (18).

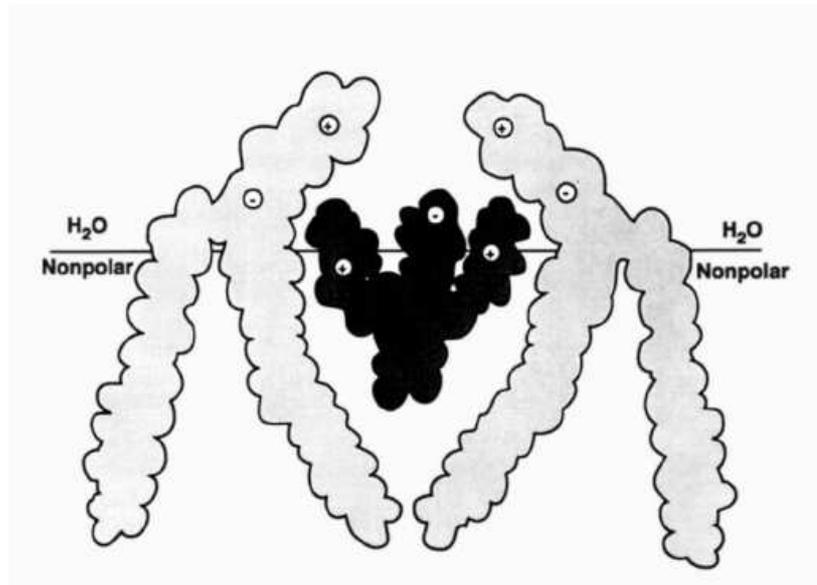


Figure 9 – Schéma représentant le mode d'interaction des hélices de classe A avec les phospholipides zwitterioniques selon le principe du « snorkel model » (19).

2.2 Caractéristiques communes des monocouches formées par les apolipoprotéines échangeables à l'interface liquide/air

Des travaux antérieurs, menés par V.M. Bolanos-Garcia, A. Renault et S. Beaufils, ont eu pour objectif d'étudier le comportement interfacial des apolipoprotéines échangeables à la surface d'une cuve de Langmuir et en l'absence de lipides (13). Un nombre important de paramètres physiques furent pris en compte pour caractériser ces monocouches, parmi eux : les valeurs maximales de la pression de surface et de la concentration de protéines par unité de surface, obtenues lorsque la surface est saturée en protéines, la concentration surfacique Γ_0 nécessaire pour initier une pression de surface non nulle, et pour finir, le coefficient de cisaillement μ de la couche une fois formée. Les valeurs de ces paramètres sont exposées dans le tableau 2 pour les apolipoprotéines A-I, A-II, C-I, C-II et C-III.

A l'équilibre thermodynamique, ces couches possèdent toutes une concentration par unité de surface semblable située entre 1.5 et 1.6 mg/m². Nous constatons également que les valeurs finales de la pression de surface sont très proches, avec des valeurs comprises entre 22.5 mN/m et 26.5 mN/m. L'étude de ces propriétés interfaciales met en évidence l'existence d'un caractère commun entre ces protéines, indifféremment de leur structure tertiaire, qui ne

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

peut-être lié qu'à la présence d'une quantité importante de répétitions d'un même motif à l'intérieur des séquences de ces protéines. D'autres auteurs ont mentionné l'existence d'un comportement commun à l'interface liquide/air pour les apolipoprotéines échangeables, qui consisterait en une orientation privilégiée de leurs hélices α parallèlement à l'interface (20, 21), tout en acceptant cependant d'explorer d'autres configurations (21, 22). Ce dernier point est également suggéré par l'augmentation de la concentration surfacique produite après que la pression de surface ait commencé à augmenter. Pourtant, les mesures réalisées à l'interface liquide/air révèlent tout de même des différences entre ces protéines. Nous constatons ainsi une variation importante dans le coefficient de cisaillement qui passe de 12 mN/m, pour l'Apo C-II à 48 mN/m pour l'Apo A-II. D'autres expériences menées sur l'Apo A-I (V.M. Bolanos-Garcia, S. Beaufils et M.Pinot, données non publiées), ont montré que cette protéine ne modifiait pas les propriétés rhéologiques d'une couche de lipides à l'interface liquide/air, lorsqu'elle s'y insérait. Cette différence dans la rigidité des films de protéine reflète une différence dans les interactions à longue et moyenne portée existant dans ces couches. Or, il a été démontré que les interactions de ce type jouaient un rôle important dans le passage de la forme discoïdale à la forme sphérique des lipoprotéines contenant l'Apo A-I (23).

Protéines	Max. Pression de Surface (mN/m)	Max. Concentration Surfacique (mg/m²)	Max. μ (après 15h) (mN/m)	Γ_0 (mg/m²)
Apo A-I	22.5	1.6	22	0.6
Apo A-II	23	1.5	48	1.2
Apo C-I	23.5	1.5	38	1.1
Apo C-II	25	1.5	12	0.8
Apo C-III	26.5	1.5	28	1.1

Tableau 2 – Comparaison de quelques propriétés physiques des monocouches formées par les apolipoprotéines échangeables à l'interface liquide/air (13).

III. Les lipoprotéines et le cycle du cholestérol

Les lipides polaires (phospholipides, cholestérol) et apolaires (triglycérides, esters de cholestérol) sont nécessaires aux besoins de l'organisme humain et sont amenés aux cellules par la voie sanguine. Cependant ces lipides n'étant pas solubles dans un milieu aqueux, ils doivent circuler dans le plasma sanguin sous la forme d'un complexe nommé lipoprotéine, où des protéines, les apolipoprotéines, forment avec les lipides polaires une membrane amphiphile permettant d'isoler les lipides les plus hydrophobes du milieu aqueux. La surface des lipoprotéines est donc l'un des principaux sites des interactions protéine - lipides ou protéine - protéine, pour les apolipoprotéines échangeables. Nous allons définir ici ce contexte biologique en décrivant tout d'abord les principales molécules présentes à la surface des lipoprotéines (phospholipides, cholestérol et apolipoprotéines), nous évoquerons ensuite les différentes classes de lipoprotéines et nous décrirons la structure de celles où la conformation de l'Apo A-I est la mieux connue (les HDL discoïdaux). Pour finir, nous évoquerons le mécanisme global de transport du cholestérol dans l'organisme, en indiquant les principales fonctions accomplies par l'Apo A-I et l'Apo AII.

3.1 Principales molécules présentes à la surface des lipoprotéines

3.1.1 Les phospholipides

Les phospholipides appartiennent à la catégorie des lipides polaires. Ils constituent avec les glycolipides les deux grandes classes de cette catégorie. La structure des phospholipides est constituée de quatre parties successives allant de l'extrémité hydrophobe à l'extrémité hydrophile, qui sont :

- Un ou deux **acides gras**. Les acides gras sont des chaînes hydrocarbonées se terminant par un groupement acide carboxylique. Ces molécules sont de différentes longueurs et peuvent posséder une ou plusieurs doubles ou triples liaisons entre leurs carbones (insaturations) (voir figure 10 et tableau 3).

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

- Un **alcool**, qui peut être soit le glycérol (pour les diacylphosphoglycérides) soit la sphingosine (pour les sphingophospholipides).
- Un **groupement phosphate**, qui constitue le début de la tête polaire.
- Un autre **alcool**, relié au groupement phosphate par une liaison ester, et qui constitue l'extrémité de la tête polaire.

Nombre de carbones	Nombre de doubles liaisons	Nom commun systématique	Nom	Formule
12	0	Laurate	<i>n</i> -Dodécanoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-$
14	0	Myristate	<i>n</i> -Tétradécanoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}^-$
16	0	Palmitate	<i>n</i> -Hexadécanoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$
18	0	Stéarate	<i>n</i> -Octadécanoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$
20	0	Arachidate	<i>n</i> -Eicosanoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-$
22	0	Béhénate	<i>n</i> -Docosanoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COO}^-$
24	0	Lignocérate	<i>n</i> -Tétracosanoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COO}^-$
16	1	Palmitoléate	<i>cis</i> - Δ^9 -Hexadécénoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
18	1	Oléate	<i>cis</i> - Δ^9 -Octadécénoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
18	2	Linoléate	<i>cis, cis</i> - Δ^9, Δ^{12} - Octadécadiénoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{CO}^-$
18	3	Linoléate	<i>all-cis</i> - $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$ - Octadécatriénoate	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
20	4	Arachidonate	<i>all-cis</i> - $\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ - Eicosatétraénoate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$

Tableau 3 – Exemples d'acides gras avec leur formule chimique. Les acides gras sont ionisés au pH physiologique (le pH du sang est d'environ 7.4) et il convient de les écrire sous leur forme carboxylate. Ces acides contiennent habituellement un nombre pair d'atomes de carbone.

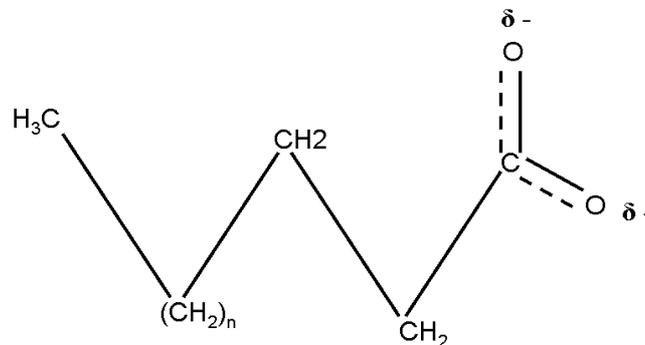


Figure 10 – Formule d'un acide gras.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

Dans le cas de la famille des diacylphosphoglycérides, les acides gras sont reliés par des liaisons esters au groupement glycérol. Le groupement glycérol est un alcool à trois carbones, sur lequel se fixe, en plus des acides gras, la tête polaire du phospholipide. Il constitue donc l'élément central de la molécule et sa structure joue un rôle important dans la structure du phospholipide (voir figure 11). L'extrémité de ces lipides est constituée d'un alcool. Ainsi, différents alcools peuvent se fixer par une liaison ester au groupement phosphate pour terminer la tête polaire. La charge de celle-ci dépendra alors de la charge portée par cet alcool (voir figure 12). En effet, comme le groupement phosphate est porteur d'une charge négative, dans le cas de la choline qui est positive, la charge globale de la tête sera neutre (la tête sera zwitterionique), dans le cas du glycérol, qui est neutre, la charge globale sera négative (la tête sera anionique).

La sphingomyéline est le lipide le plus connu de la famille des sphingophospholipides. Il s'agit d'un lipide polaire membranaire qui ne dérive pas du glycérol. En fait, la colonne vertébrale de la sphingomyéline, comme pour les autres membres de sa famille est la sphingosine, alcool aminé possédant une longue chaîne hydrocarbonée insaturée (figure 13). Dans la sphingomyéline, le groupe amine du squelette sphingosine est relié à un acide gras par une liaison amide, et le groupe hydroxyle primaire de la sphingosine est estérifié par la phosphorylcholine.

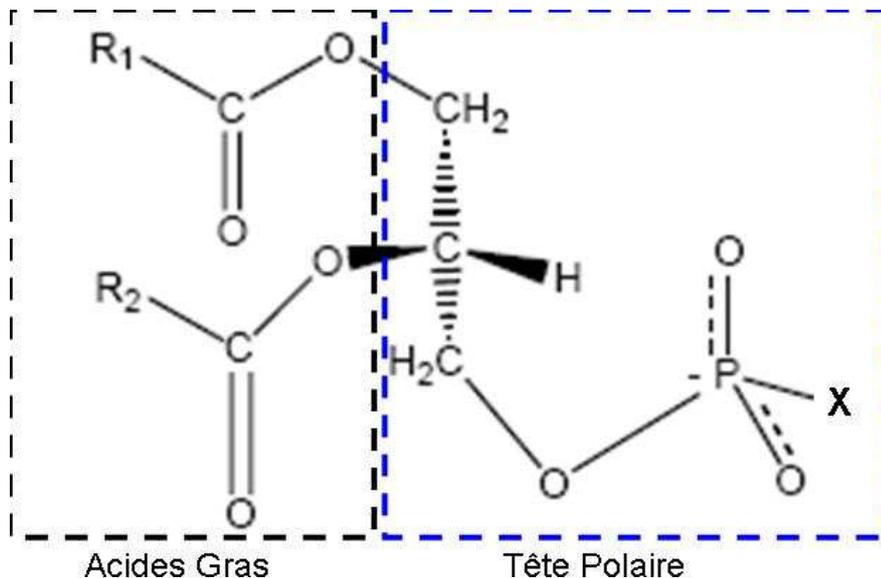


Figure 11 – Structure générale d'un diacylphosphoglycéride, les groupements R_1 et R_2 indiquent la position des chaînes hydrocarbonées des acides gras et X indique la position de l'alcool. Le carbone central C-2, appartenant au glycérol, est représenté dans sa configuration absolue.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

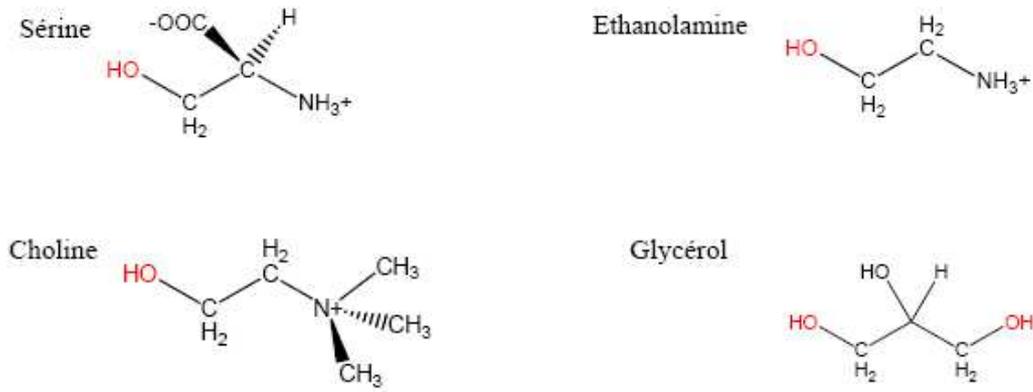


Figure 12 – Principaux alcools constituant la tête polaire des phosphoglycérides. Lors d'une liaison ester le groupement OH marqué en rouge est libéré, permettant ainsi au carbone sur lequel il était fixé de se lier à un oxygène du groupement phosphate.

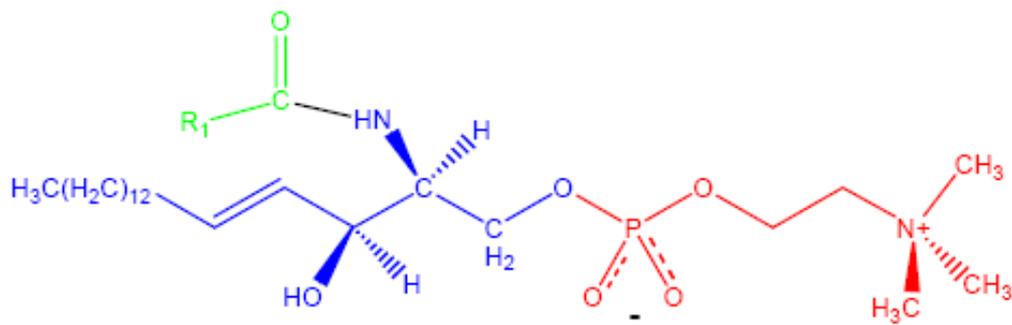


Figure 13 – Structure de la sphingomyéline, la partie sphingosine est marquée en bleu, l'acide gras en vert et la phosphorylcholine en rouge.

3.1.2 Les apolipoprotéines

Plus d'une quinzaine d'apolipoprotéines sont actuellement décrites dans la littérature. Les caractéristiques des principales apolipoprotéines sont présentées dans le tableau 4. Les fonctions de ces protéines interviennent à différents niveaux. Tout d'abord, elles jouent un rôle clé sur la structure de la lipoprotéine, par l'intermédiaire de leurs hélices α amphiphiles.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

Ensuite, elles vont exercer un autre rôle en interagissant avec d'autres protéines, qui sont soit des enzymes, soit des récepteurs membranaires.

Apolipoprotéine	Masse moléculaire (kDa)	Site de synthèse	Concentration plasmatique (g/L)	Fonctions principales
Apo A-I	28	Foie, intestin	1,20	P-Struct. des HDL, Act. de la LCAT et Lg. de ABCA1 et SRB1.
Apo A-II	17 (dimère)	Foie, intestin	0,40	P-Struct. des HDL, Act. de la LH.
Apo A-IV	46	Foie, intestin	0,15	Act. de la LCAT.
Apo A-V	39	Foie	$0,15 \cdot 10^{-3}$	Act. de la LPL
Apo B-100	549	Foie	0,90	P-Struct. des VLDL et LDL, Lg. du récepteur R-LDL.
Apo B-48	246	Intestin	-	P-Struct. des chylo-microns.
Apo C-I	6,5	Foie	0,05	Act. de la LCAT, inhib. de la CETP
Apo C-II	8,5	Foie	0,04	Act. de la LPL.
Apo C-III	8,7	Foie	0,12	Inhib. De la LPL.
Apo E	39	Foie	0,05	Lg. des récepteurs R-LDL et LRP.

Tableau 4 – Caractéristiques des principales apolipoprotéines (24).

P-Struct. : protéine de structure, *Act.* : activation, *Inhib.* : inhibition et *Lg* : ligand

3.1.3 Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide appartenant à la famille des stérols. Nous retrouvons les membres de cette famille dans les règnes animaux végétaux et microbiens. La structure du cholestérol est très différente de celle des phospholipides (voir figure 14), il est beaucoup plus compact et apolaire que ces derniers. Il est construit à partir de l'union de quatre cycles hydrocarbonés. Une partie hydrocarbonée est fixée sur l'un des cycles à l'une des extrémités

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

de la molécule, et un groupement OH est fixé sur un autre cycle à l'autre extrémité de la molécule. Le groupement OH est la seule partie polaire du cholestérol, il est donc orienté de façon à être en interaction avec les têtes polaires des phospholipides environnants, tandis que le reste de la molécule s'aligne parallèlement à leurs chaînes acyl.

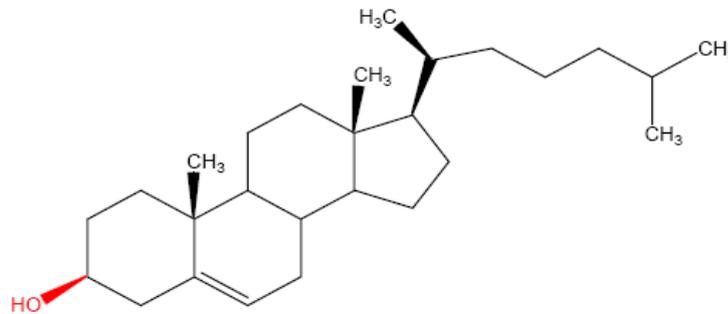


Figure 14 – Structure du cholestérol

Le cholestérol libre présent à la surface des lipoprotéines de haute densité (HDL) est estérifié par la LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase). La réaction enzymatique comporte deux étapes (24) : premièrement, l'hydrolyse d'un des acides gras des phospholipides, ce qui génère un lyso-phospholipide (phospholipide avec un seul acide gras) et un acide gras libre, deuxièmement, l'estérification du cholestérol libre par l'acide gras hydrolysé (le groupe OH est remplacé par l'acide gras hydrolysé). Le cholestérol estérifié, qui a donc perdu son groupement hydrophile, pénètre alors dans le coeur hydrophobe de la particule.

3.2 Composition et structure des lipoprotéines

Il existe différents types de lipoprotéines. Elles sont classées par densité croissante : les chylomicrons, les VLDL (Very Low Density Lipoprotein), les LDL (Low Density Lipoprotein), les HDL2 et HDL3 (High Density Lipoprotein). La composition chimique des lipoprotéines varie avec leur densité. Ainsi, nous retrouvons dans le tableau 5 la fraction massique occupée par chaque constituant : phospholipides, cholestérol estérifié ou libre, triglycérides (lipides entièrement hydrophobes) et protéines pour chaque catégorie de lipoprotéine. Nous constatons donc que les apolipoprotéines A-I et A-II sont principalement associées aux lipoprotéines de haute densité : les HDL.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

Pour comprendre les mécanismes qui régissent l'adsorption ou l'insertion des apolipoprotéines à la surface des lipoprotéines, il est important de connaître la composition surfacique de ces complexes. Ainsi, la sphingomyéline et les phospholipides avec une tête phosphatidylcholine sont les deux principales catégories de lipides polaires trouvées à la surface des lipoprotéines. D'autres phospholipides y sont présents en minorité, comme les phospholipides à tête éthanolamine (zwitterionique) et ceux à tête inositol (anionique) (25). Cependant, la composition lipidique surfacique varie également d'une classe de lipoprotéines à une autre. Par exemple, les phospholipides avec une tête phosphatidylcholine ont des chaînes acyl (chaînes hydrocarbonées obtenues à partir des acides gras) plus saturées à la surface des LDL qu'à la surface des HDL. De plus, le rapport sphingomyéline sur phosphatidylcholine et le rapport cholestérol libre (non estérifié) sur phospholipides sont tous deux plus élevés pour les LDL que pour les HDL (26, 27). Ceci pourrait avoir comme incidence de limiter l'insertion de certaines protéines dans la membrane des LDL.

Classe	CE	CL	TG	PL	Protéines	Principales apolipoprotéines
Chylomicrons	3	1	90	4	2	B48, CI, CII, CIII, E
VLDL	12	6	60	14	8	B100, CI, CII, CIII, E
IDL	26	10	30	20	14	B100, E
LDL	40	11	5	22	22	B100
HDL	18	5	7	25	45	AI, AII, AIV, CI, CIII, E

Tableau 5 – Composition chimique des lipoprotéines (% de la masse totale).

CE : cholestérol estérifié, CL : cholestérol libre, TG : triglycérides, PL : phospholipides (24).

Le schéma le plus général sur la structure des lipoprotéines est une sphère constituée d'un noyau hydrophobe (ester de cholestérol, triglycérides) entouré d'une couronne périphérique amphiphile. Cette couronne correspond à une monocouche (couche dont l'épaisseur est d'une seule molécule) constituée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (voir figure 15). Cependant, lors de leur création, les HDL ont une forme discoïdale du fait de l'absence de matière hydrophobe au centre de celles-ci (voir figure 15).

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

Ainsi, l'étude de l'interaction des apolipoprotéines avec une monocouche de phospholipides modélise plutôt la surface des HDL matures que celle des HDL naissants.

Les HDL naissants sont formés par une bicouche de phospholipides, entourée par des apolipoprotéines A-I afin d'isoler les chaînes acyl des phospholipides du milieu aqueux. Parmi les modèles permettant de décrire les HDL discoïdaux, il existe deux modèles principaux. Le premier modèle est le modèle dit « Picket-Fence » (« piquets de clôture ») (28), où deux apolipoprotéines A-I entourent le disque de phospholipides, l'une à la suite de l'autre, en plaçant leurs hélices α parallèlement aux chaînes acyl des phospholipides (voir figure 15). De cette manière, chaque protéine crée des interactions intramoléculaires fortes entre ses hélices, et des interactions intermoléculaires faibles avec l'autre protéine présente sur le disque. Dans le second modèle ou modèle dit « Double-Belt » (« double ceinture ») (29), deux apolipoprotéines A-I parallèles entre elles entourent le disque de phospholipides en plaçant leurs hélices α perpendiculairement aux chaînes acyl des phospholipides (voir figure 15). De cette manière, chaque protéine crée des interactions intermoléculaires fortes avec l'autre protéine présente sur le disque et des interactions intramoléculaires faibles entre ses hélices. Ce deuxième modèle est le modèle privilégié à l'heure actuelle. La configuration de l'Apo A-I dans les HDL sphériques a, quant à elle, été beaucoup moins étudiée.

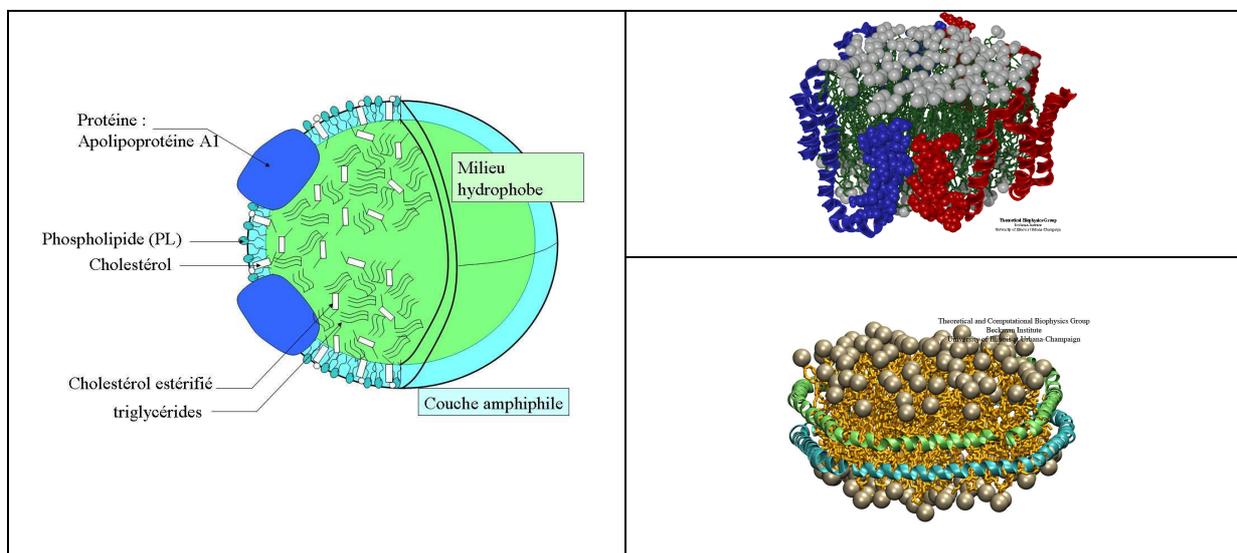


Figure 15 – A gauche - un HDL sphérique, avec en vert : le cœur hydrophobe et en bleu : la couche périphérique amphiphile. L'orientation de la protéine dans ce type d'HDL est encore mal connue. A droite - deux modèles proposés pour les HDL discoïdaux, en haut - le modèle « Picket-Fence », les 2 Apo A-I ont des hélices α parallèles aux chaînes acyl des phospholipides, et en bas - le modèle « Double-Belt », les 2 Apo A-I ont des hélices α perpendiculaires aux chaînes acyl des phospholipides (30).

3.3 Métabolisme des lipoprotéines

Afin d'expliquer les principales fonctions biologiques de l'Apo A-I et de l'Apo A-II, nous allons décrire ici le schéma général représentant le métabolisme des lipoprotéines. Celui-ci peut être décomposé en trois voies principales (24), qui sont les suivantes :

- une voie exogène, correspondant au métabolisme des chylomicrons, particules issues des intestins comportant les graisses d'origines alimentaires.
- une voie endogène, correspondant au métabolisme des VLDL, qui sont synthétisées par le foie à partir des acides gras issus des chylomicrons ou libérés par les tissus adipeux. Le métabolisme des VLDL conduira à la production des LDL. Ces LDL constituent le produit final de cette voie endogène, et seront captées par le foie ou par les tissus périphériques.
- une voie inverse correspondant au métabolisme des HDL, qui assurent le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

Après absorption des graisses d'origine alimentaire, l'intestin grêle sécrète des chylomicrons, dont la demi-vie est très courte, de l'ordre de quelques minutes. Les chylomicrons natifs sont constitués majoritairement de triglycérides. La lipoprotéine lipase (LPL) va hydrolyser ces triglycérides pour les transformer en acides gras libres et en glycérol. Les acides gras libérés sont soit stockés par le tissu adipeux, soit utilisés par les tissus périphériques comme source d'énergie, soit encore réutilisés pour la synthèse hépatique des VLDL (31). Ces chylomicrons appauvris en triglycérides finissent leur vie en étant captés par le foie.

La voie endogène commence avec la synthèse des VLDL par le foie. Leur production est stimulée par les acides gras libres captés par le foie après un repas riche en graisse ou libérés par le tissu adipeux à jeun. Comme dans le cas des chylomicrons, la LPL va hydrolyser les triglycérides contenus dans le cœur hydrophobe de la lipoprotéine pour former des acides gras, et transformer rapidement les VLDL en lipoprotéine de plus forte densité : les IDL. Ces IDL par l'action de la lipase hépatique (LH) vont à leur tour se transformer en LDL. Cependant, seulement 50% des VLDL sont transformés en LDL, le reste est capté par le foie sous la forme de remnants de VLDL ou d'IDL. Les LDL assurent la distribution aux cellules

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

du cholestérol qui est nécessaire à l'édification des membranes cellulaires, ainsi qu'à la synthèse des VLDL, des composés biliaires et des hormones stéroïdes. Cependant les LDL peuvent également selon certaines conditions physiopathologiques, subir des phénomènes d'oxydation et être captées par les récepteurs des macrophages, qui sont impliqués dans la genèse de la plaque de cholestérol obstruant les artères, nommée plaque d'athérome. Les LDL constituent ainsi la fraction la plus athérogène des lipoprotéines.

Il existe une troisième voie, communément appelée « Transport Inverse du Cholestérol », dans laquelle sont impliquées l'Apo A-I et l'Apo A-II. Cette voie assure le transport jusqu'au foie du cholestérol apporté par les LDL aux tissus périphériques, afin qu'il y soit recyclé ou éliminé par la bile. Ce processus, assuré par les HDL, s'oppose à l'accumulation du cholestérol dans la paroi artérielle et exerce un effet potentiellement anti-athérogène. Ainsi, une mesure de la concentration du cholestérol HDL est un marqueur du risque cardiovasculaire bien établi. Le transport inverse du cholestérol comporte quatre étapes (24) :

- La prise en charge du cholestérol libre (non estérifié) des cellules par les HDL.
- L'estérification du cholestérol libre.
- Le transfert du cholestérol des HDL vers les lipoprotéines de plus faibles densités.
- Le captage des HDL par le foie.

La reconnaissance d'une protéine nommée ABC-1 par l'Apo A-I, à l'extérieur de la cellule, amorce le processus de transfert du cholestérol libre intracellulaire vers les HDL. L'origine des HDL est multiple, elles peuvent être produites au cours de la fusion ou de l'hydrolyse d'autres HDL, mais aussi lors de la lipodation extracellulaire de l'Apo A-I suite à son interaction avec l'ABC-1.

Après leur création, les HDL ont une forme discoïdale (voir section 3.2). Cependant, au cours du métabolisme, le cholestérol libre présent à la surface des HDL va être estérifié par la LCAT (voir section 3.1). Le cholestérol estérifié va alors migrer vers le cœur hydrophobe de la lipoprotéine et provoquer la transformation de la particule discoïdale en particule sphérique. L'activité enzymatique de la LCAT est probablement déclenchée par le domaine central de l'Apo A-I, qui serait alors moins inséré dans la membrane que les autres segments de la protéine (32). L'estérification du cholestérol libre provoque une augmentation du volume de la particule, qui devra augmenter la quantité de phospholipides et d'apolipoprotéines présents sur son enveloppe. Les HDL vont ensuite échanger avec d'autres

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

lipoprotéines de plus faibles densités, une partie du cholestérol estérifié qu'elles contiennent (VLDL, IDL et LDL) contre des triglycérides et ceci grâce à l'intervention d'une autre protéine : la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein). Cet échange favorise le retour du cholestérol jusqu'au foie, et s'accompagne également d'un remodelage des HDL en modifiant la quantité de phospholipides à leur surface. Les HDL seront eux-même absorbés par le foie suite à l'interaction de certaines apolipoprotéines avec les récepteurs à la surface du foie (notamment entre l'Apo A-I et SRB1).

Tout comme l'Apo A-I, l'Apo A-II est également un constituant protéique majeur des HDL. Sa principale fonction biologique, connue à l'heure actuelle, consiste à prendre la place de l'Apo A-I à la surface des HDL. Ce processus s'effectue sans affecter significativement les propriétés structurales de la lipoprotéine et serait possible grâce à une plus forte affinité de l'Apo A-II pour le lipide que l'Apo A-I. L'une des conséquences biologiques de ce déplacement de l'Apo A-I par l'Apo A-II pourrait être l'augmentation de la dégradation des HDL par le foie (33).

IV. Relation entre structure et fonctions pour l'Apo A-I et l'Apo A-II

4.1 L'apolipoprotéine A-I

L'Apolipoprotéine A-I (Apo A-I) est principalement associée aux lipoprotéines de type HDL (High Density Lipoprotein), il s'agit du principal constituant protéique de cette classe de lipoprotéine. Elle joue un rôle important dans la détermination de leur taille. En plus de son interaction avec les phospholipides, l'Apo A-I a la possibilité de créer des interactions spécifiques avec d'autres protéines, accomplissant ainsi des fonctions essentielles dans le métabolisme de ces HDL. L'Apo A-I interagit ainsi avec l'ABCA1, la LCAT et la SRB1, afin de réaliser les processus biologiques qui ont été décrits dans la section 3.3.

La séquence de l'Apo A-I fut déterminée par Brewer et al. en 1978 (34). L'Apo A-I est constituée de 243 acides aminés (sa masse moléculaire est de 28.1 kDa), qui peuvent être regroupés en deux parties : le domaine N-terminal (comprenant les résidus 1 à 43), qui est encodé par l'exon 3 du gène de cette protéine et le domaine comprenant la partie centrale

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

ainsi que la partie C-terminal de cette protéine (comprenant les résidus 44 à 243), qui est encodé par l'exon 4 du même gène.

4.1.1 Structure et fonction du segment codé par l'exon 4

La comparaison entre les séquences des mammifères indique que le domaine N-terminal de l'Apo A-I est fortement conservé tandis que la partie codée par l'exon 4 montre des substitutions entre les espèces (35). Cependant, en dépit de ces changements dans la structure primaire, la structure secondaire apparaît comme étant fortement conservée. Ce qui montre l'importance de cette structure dans la conservation des fonctions biologiques essentielles.

Des travaux antérieurs (36) ont permis de révéler que la structure de la protéine sans la terminaison N contenait 10 hélices amphiphiles, la plupart étant séparées par un « coude » produit par la présence d'une proline. Huit de ces hélices sont constituées par des motifs 22-mer, et deux, par des motifs 11-mer. La détermination de la structure de cette partie de la protéine, à l'état non lié aux lipides et pour une résolution de 3 Å, a permis de confirmer ces résultats (37, 38). Ainsi, nous pouvons voir sur cette structure, montrée par la figure 16, dix hélices α qui s'étendent successivement les unes à la suite des autres, tout en donnant au monomère une forme de « fer à cheval », à cause du changement d'orientation de l'axe des hélices imposé par chaque proline. Nous constatons également que la région C-terminal possède une hélice α plus courte, séparée des autres hélices par une région non hélicoïdale.

Sur la même figure, nous pouvons voir que les monomères d'Apo A-I s'assemblent en un tétramère en forme d'ellipse, composé de deux dimères. Chacun de ces dimères est formé de deux monomères arrangés de façon antiparallèle. Ainsi, la forme de ces dimères rappelle très fortement la configuration de l'Apo A-I dans les HDL discoïdaux selon le modèle « Double-Belt » (voir section 3.2).

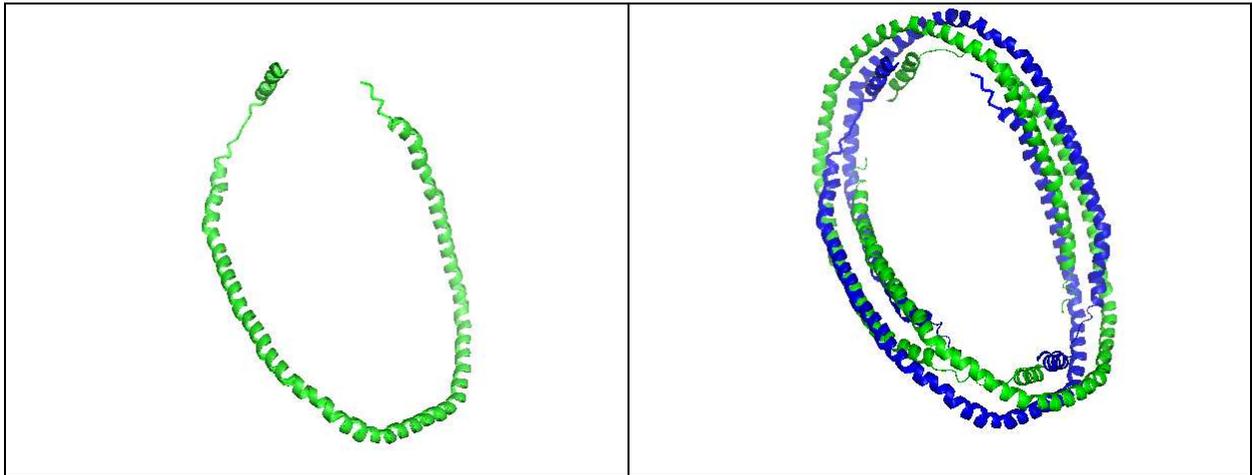


Figure 16 - Structure cristallographique de l'Apo A-I sans les résidus [1 – 43] et non liée aux lipides. Cette structure fut déterminée avec une résolution de 3 Å. A gauche : nous avons un monomère, où la forme en « fer à cheval » est due à la présence de prolines entre les hélices. A droite : nous avons l'arrangement en tétramère obtenu lors de la cristallisation, où les monomères sont arrangés anti-parallèlement (37, 38).

4.1.2 Lien entre structure secondaire et affinité aux lipides

Les mesures de dichroïsme circulaire ont démontré l'implication des hélices alpha de l'Apo A-I dans les liaisons avec les lipides. En effet, cette protéine est composée de 40 à 50 % d'hélices alpha en l'absence de lipides et jusqu'à 75 % lorsqu'elle est liée aux lipides ((39) et (40)).

Le domaine codé par l'exon 4 possède 6 hélices de classe A créées par les domaines 22-mer, et 4 hélices de classe Y (17) (voir figure 17). Les hélices alpha amphipathiques de classe A sont caractérisées par un haut moment hydrophobe et une distribution unique des résidus chargés (34) (voir section 2.1). Cependant des mesures expérimentales indiquent que les hélices de classe A appartenant à l'Apo A-I n'ont pas forcément une grande affinité pour les lipides. Palgunachari et co-auteurs ont démontré que seulement deux de ces hélices (acides aminés 44 à 65 et 220 à 241), ont une affinité significative pour les lipides (41). L'une de ces deux hélices (résidus 220 à 241) appartient au domaine C-terminal, et il a été démontré que la présence de ce domaine était indispensable pour l'initiation d'une liaison entre la protéine et les lipides (35).

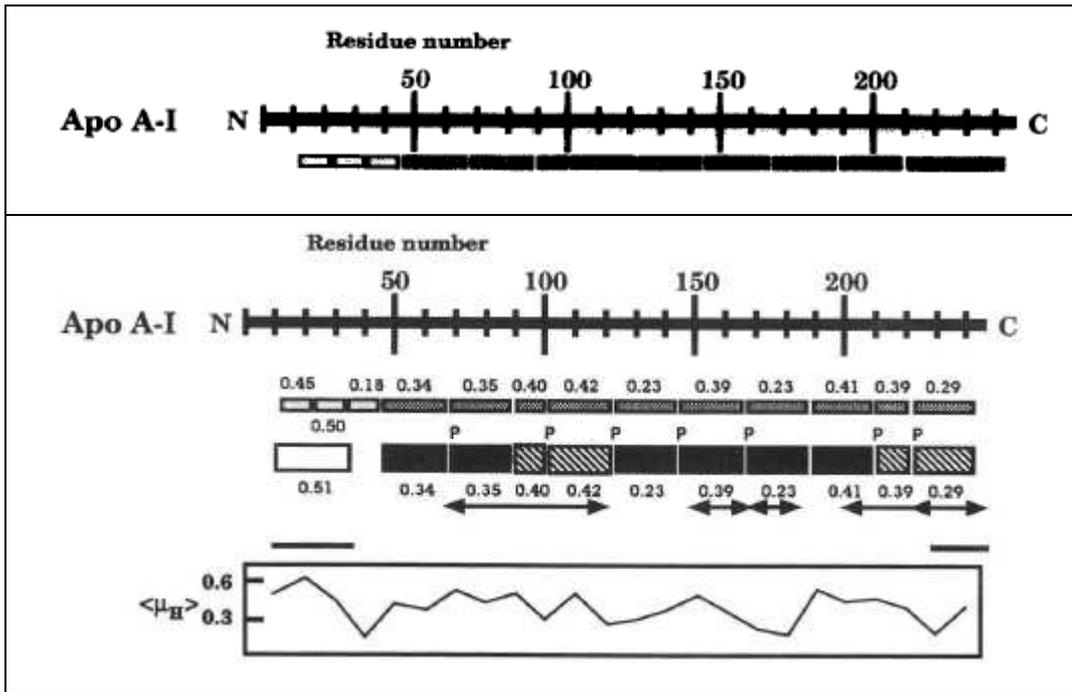


Figure 17 – Sur la séquence de l'Apo A-I - en haut - nous voyons la répartition des motifs 11 ou 22-mer, codés par l'exon 4 (en noir) et celle des motifs 11-mer, codés par l'exon 3 (en blanc)- en bas - nous voyons la répartition des hélices α amphipathiques et leur classe A (noir), Y (hachuré) et G* (blanc). Les traits avec doubles flèches représentent les parties liantes aux lipides, tandis que les traits sans doubles flèches représentent les parties qui ne le sont pas. Juste en dessous, se situent les valeurs du moment hydrophobe par résidu, calculé sur des segments de 11 acides aminés (19).

Les hélices alpha de la partie centrale de la protéine semblent ne pas jouer de rôle essentiel dans l'initiation de la liaison avec les lipides. Cependant, des hélices appartenant à cette région (hélices 100 à 121 et 122 à 143) pourraient avoir une importance dans la stabilisation du complexe lipides – protéines. Les segments impliqués dans l'activation de la LCAT ont été localisés sur la partie centrale de l'Apo A-I (42).

4.1.3 Structure tertiaire et quaternaire de l'ensemble de la protéine

L'Apo A-I possède certaines caractéristiques des protéines globulaires. En effet, plusieurs facteurs indiquent que sa structure est relativement flexible : une énergie de dénaturation faible (43, 44), une hétérogénéité de la vitesse de sédimentation (23). Ce qui permet une interaction rapide de ses acides aminés hydrophobes avec les lipides des vésicules de DMPC, pour former des HDL discoïdaux (45, 46).

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

L'Apo I existe sous forme monomérique, pour des concentrations inférieures à 0.1 mg/mL. Il a été suggéré, qu'en solution, les domaines C-terminal et N-terminal pouvaient créer des interactions entre eux, ce qui permettrait de stabiliser la structure globale de la protéine (47, 48). Au dessus de cette concentration, la protéine s'auto-associe en impliquant, semble-t-il, les segments hélicoïdaux situés sur la partie C-terminal, qui peuvent alors se stabiliser (49).

Ainsi, dans un premier temps, l'étude de l'Apo A-I semblait indiquer que la terminaison N était uniquement importante pour la stabilisation de la protéine en solution en l'absence de lipides ((50), (51)). L'affinité de ce domaine pour les lipides est ainsi faible, malgré la présence d'un domaine amphipathique fortement liant aux lipides (acides aminés 44 à 65) (41) (voir section 4.1.2 de ce chapitre). Cependant certaines études suggéraient déjà que ce domaine pouvait exercer une influence dans la formation de complexes lipides - protéines, en favorisant l'accessibilité à certaines hélices liantes (35). Des études récentes amènent maintenant, à revoir certaines considérations sur la structure tertiaire de la protéine (52-56). Le domaine N-terminal et la partie centrale de la protéine (résidus de 1 à 187) s'organiseraient dans un paquet d'hélices α arrangées de façon anti-parallèle (55, 56). Le domaine C-terminal, constitué par les résidus 188 à 243, serait quand à lui moins organisé (57). Ce modèle semble en accord avec la structure cristallographique de l'Apo A-I entière, montrée sur la figure 18 (54).

Saito et co-auteurs ont ainsi proposé un mécanisme en deux étapes pour la liaison de l'Apo A-I à la surface des particules lipidiques sphériques (voir figure 19) (52, 57). Dans un premier temps, les hélices α du domaine C-terminal initient la liaison aux lipides. Ce processus est accompagné d'une augmentation de la proportion d'hélices dans cette partie de la protéine. Dans un deuxième temps, le paquet d'hélices présent dans la région N-terminal s'ouvre et les interactions hélice - hélice sont alors remplacées par des interactions hélice - lipides. Cette seconde interaction est également accompagnée d'une augmentation de l'hélicité dans la protéine, concernant les résidus 123 à 142 (58) et 1 à 43 (59-61).

Des mesures calorimétriques ont mis en évidence que la liaison de l'Apo A-I aux lipides impliquait un processus exothermique, ce qui indiquerait que le changement conformationnel des segments non organisés (« Random Coil ») vers une structure en hélice α produit l'énergie nécessaire à la liaison de la protéine aux lipides (62). Cependant, selon cette même étude, la liaison de l'Apo A-I à une couche de lipides fluide, n'impliquerait pas d'échange de chaleur, ce qui indiquerait alors une liaison guidée par l'entropie, où la protéine

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

remplacerait à l'interface les molécules d'eau situées entre les têtes polaires des phospholipides.

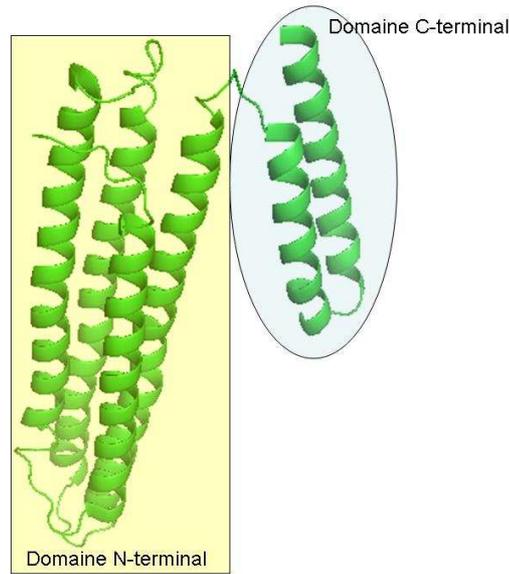


Figure 18 - Structure cristallographique de l'Apo A-I intacte et non liée aux lipides. Cette structure fut déterminée avec une résolution de 2.4 Å (54). L'Apo A-I est constituée d'un paquet de 4 hélices regroupant le domaine N-terminal et la partie centrale, tandis que la partie C-terminal comporte deux hélices anti-parallèles.

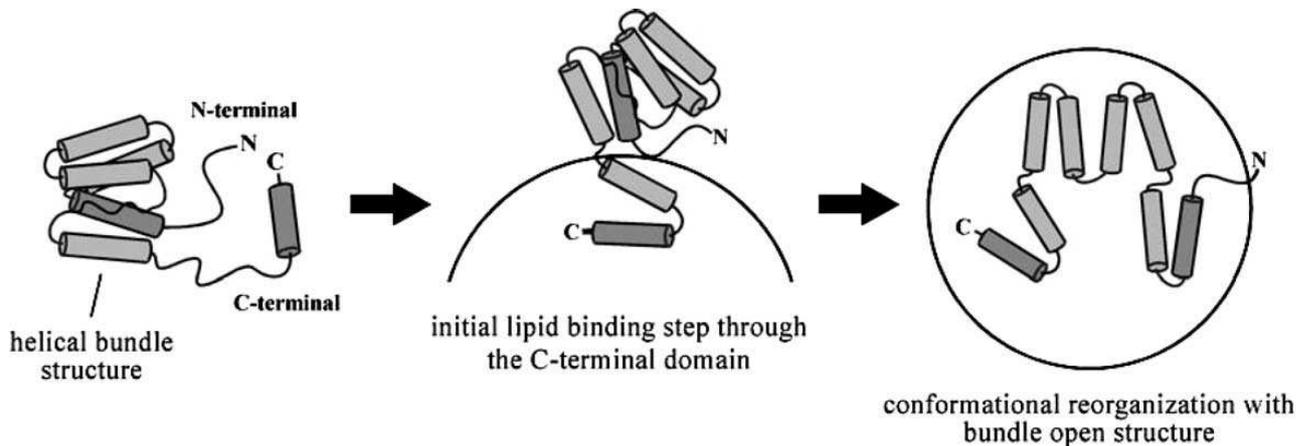


Figure 19 – Modèle en deux étapes pour le mécanisme de liaison de l'Apo A-I à la surface des particules lipidiques sphériques. A l'état libre, l'Apo A-I est organisée en deux domaines structuraux : le domaine C-terminal est peu organisé, tandis que les parties centrale et N-terminal sont structurées en un seul paquet d'hélices α . La liaison est initiée par l'augmentation de l'hélicité dans la région C-terminal, ensuite le paquet d'hélices s'ouvre et transforme les interactions hélice - hélice en interactions hélice - lipides (57).

4.2 L'apolipoprotéine A-II

L'Apo A-II humaine est la principale protéine des HDL après l'Apo A-I. Cette protéine joue un rôle important dans le métabolisme de ces lipoprotéines. L'une des ces fonctions biologiques consiste ainsi à déplacer l'Apo A-I de la surface des HDL, ce qui produit à la fois un effet sur le métabolisme des HDL et sur leur structure. L'Apo A-II chez l'être humain est constituée de deux chaînes polypeptidiques de 77 acides aminés (8.708 kDa), reliées par un pont disulfure au niveau du résidu numéro 6 et formant ainsi un dimère (63, 64). A ce jour, deux structures cristallographiques de l'Apo A-II ont été publiées. L'une correspond à la protéine humaine à l'état naturel (65), et l'autre correspond à la protéine associée à un détergent : le β -octyl-glucopyranoside, couramment utilisé pour solubiliser les protéines membranaires (65).

4.2.1 Analyse de la structure de l'Apo A-II à l'état pur

La structure cristallographique de l'Apo A-II en l'absence de détergent a été obtenue à une résolution de 2 Å (65), elle est présentée sur la figure 19. Chaque chaîne polypeptidique possède trois longues hélices α , qui sont ponctuées par des prolines, d'une façon similaire à celle qui a pu être observée sur l'Apo A-I (pour la structure obtenue sur le segment comprenant les résidus 44 à 243). De courtes hélices de type 3_{10} comprenant 3 à 4 résidus sont situées entre ces longues hélices (65). La configuration globale de la protéine montre que les chaînes polypeptidiques sont compactées dans un arrangement qui rappelle le paquet d'hélices α du domaine N-terminal de l'Apo A-I entière. Chaque dimère contient trois longues zones hydrophobes, correspondant aux résidus 6 à 29, 41 à 53 et 60 à 70, sur chacune des chaînes. Ces zones hydrophobes permettent aux dimères d'interagir fortement entre eux à l'intérieur du cristal de protéines (voir figure 19) (65). L'analyse de la répartition des motifs répétés nous indique globalement que la moitié de la protéine est constituée de motifs 11-mer (codés par l'exon 3) et l'autre moitié par des motifs 11/22-mer (codés par l'exon 4) (voir figure 20) (19).

4.2.2 Analyse de la structure de l'Apo A-II associée à un détergent

Des études à partir de peptides synthétiques représentant des fragments de l'Apo A-II ont mis en évidence des sites de liaisons entre protéine et lipides (19). Les sites liants et non liants sont indiqués sur la figure 21. Il apparaît ainsi qu'au moins deux sites distincts sont liants sur chaque chaîne polypeptidique. L'analyse de la séquence primaire a, quant à elle, révélé l'existence de trois domaines amphipathiques de classe A sur cette protéine. La position et la longueur de ces domaines sont exposées sur la figure 21. La structure cristallographique de l'Apo A-II associée au β -octyl-glucopyranoside montre une configuration globale très différente de l'état naturel (65) (voir figure 20). Les assemblages de dimères n'ont plus la même courbure ni la même orientation qu'à l'état pur. Nous constatons que si l'assemblage des dimères sans détergent peut faire penser à la structure cristallographique de l'Apo A-I intacte, alors cette nouvelle configuration en forme de boucle, lors de la présence de détergent, est plus proche de celle de l'Apo A-I sans le domaine N-terminal. Cette configuration rappelle le modèle « Double-Belt » adopté par l'Apo A-I dans les HDL discoïdaux, puisque les chaînes polypeptidiques, en plus de former une boucle, placent les hélices α perpendiculairement aux chaînes acyl des lipides (65). Ainsi les chaînes polypeptidiques de l'Apo A-I et de l'Apo A-II créent des structures de configuration semblable malgré leur différence de longueur. Pour finir, nous ajoutons que la formation de paquets d'hélices α de longue taille, en l'absence ou en faible quantité de lipides, est un arrangement commun observé à ce jour sur deux autres apolipoprotéines, l'Apo E et l'apolipoporphine III (l'une des trois apolipoprotéines des insectes) (65).

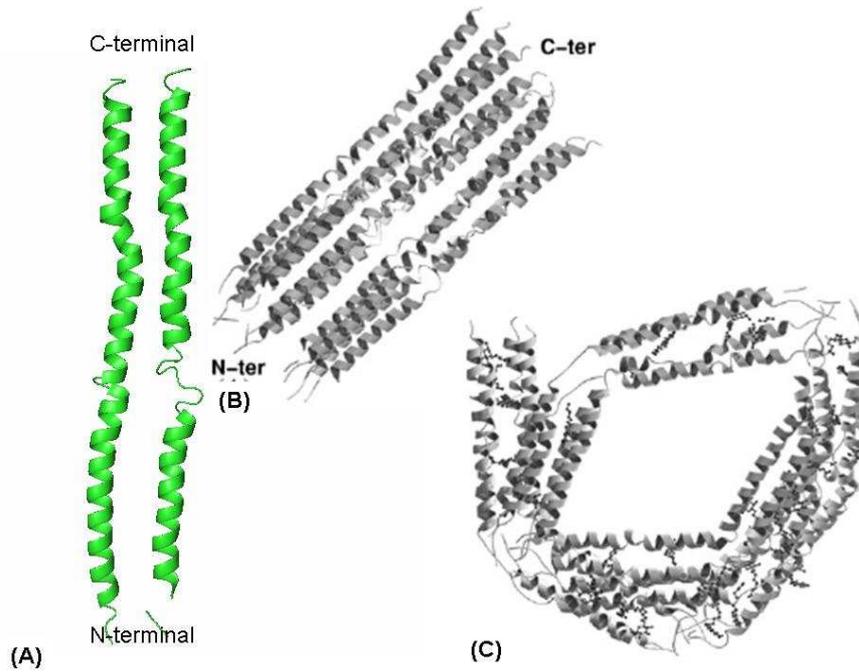


Figure 20 - Structure cristallographique de l'Apo A-II intacte, à l'état pur (65) : les chaînes polypeptidiques sont associées sous la forme de dimères (A), eux même impliqués dans un plus grand assemblage (B). La résolution est de 2.7 - 2.5 Å.

Structure cristallographique de l'Apo A-II intacte en présence de β -octylglucopyranoside et avec une résolution de 2.7 – 2.6 Å (C) (65). Nous constatons un changement radical dans la courbure et dans la compaction des hélices, qui sont orientées perpendiculairement aux chaînes des détergents.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

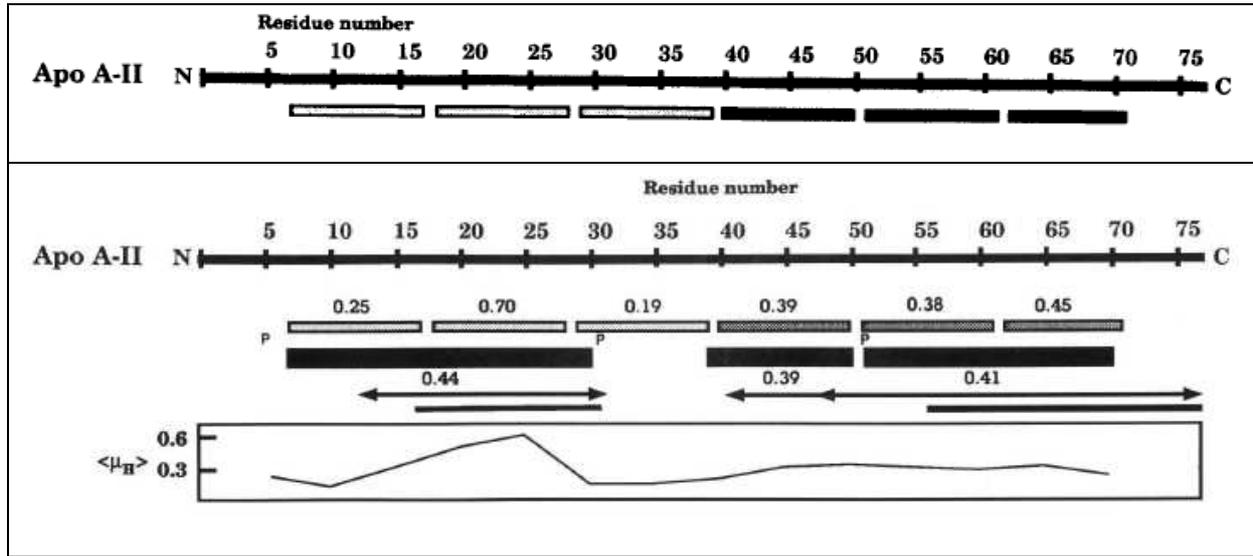


Figure 21 – Sur la séquence de l'Apo A-II - en haut - nous voyons la répartition des motifs 11 ou 22-mer, codés par l'exon 4 (en noir) et celle des motifs 11-mer, codés par l'exon 3 (en blanc) - en bas - nous voyons la répartition des hélices α amphipathiques de classe A (rectangles noirs) (les classes d'hélices Y et G* ne sont pas présentes sur cette protéine). Les traits avec doubles flèches représentent les parties liantes aux lipides, tandis que les traits sans doubles flèches représentent les parties qui ne le sont pas (données issues de travaux sur des peptides synthétiques). Juste en dessous, se situe les valeurs du moment hydrophobe par résidu, calculé sur des segments de 11 acides aminés (19).

Bibliographie du chapitre 1

1. Bottier C. 2006. *Caractérisation des puroindolines, des galactolipides du blé et de leurs interactions : Mesures physiques aux interfaces*. Université de Rennes 1.
2. Nölting B. 2006. *Protein Folding Kinetics - Biophysical Methods 2nd Edition*. Springer.
3. Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157:105-132.
4. Pauling, L., and R. B. Corey. 1951. Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds. *PNAS* 37:729-740.
5. Stryer L., Berg J.M., and Tymoczko J.L. 2003. *Biochimie (5è Edition)*. Médecine-Sciences (Flammarion).
6. Molecular Station (Web site). <http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images/505-protein-pictures/47-structure-hemoglobin.html>.
7. Ohno S. 1970. *Evolution by gene duplication* Springer. Berlin. Alemania.
8. Andrade, M. A., C. Perez-Iratxeta, and C. P. Ponting. 2001. Protein Repeats: Structures, Functions, and Evolution. *Journal of Structural Biology* 134:117-131.
9. Marcotte, E. M., M. Pellegrini, T. O. Yeates, and D. Eisenberg. 1999. A census of protein repeats. *Journal of Molecular Biology* 293:151-160.
10. Andrade, M. A., C. Petosa, S. I. O'Donoghue, C. W. Müller, and P. Bork. 2001. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *Journal of Molecular Biology* 309:1-18.
11. McLachlan A.D. 1983. Analysis of gene duplication repeats in the myosin rod. *J Mol Biol.* 169:15-30.
12. Beaufils, S., J. G. n. Grossmann, A. Renault, and V. M. Bolanos-Garcia. 2008. Characterization of the Tetratricopeptide-Containing Domain of BUB1, BUBR1, and PP5 Proves That Domain Amphiphilicity over Amino Acid Sequence Specificity Governs Protein Adsorption and Interfacial Activity. *The Journal of Physical Chemistry B* 112:7984-7991.
13. Bolanos-Garcia, V. M., A. Renault, and S. Beaufils. 2008. Surface Rheology and Adsorption Kinetics Reveal the Relative Amphiphilicity, Interfacial Activity, and Stability of Human Exchangeable Apolipoproteins. *Biophys J.* 94:1735-1745.
14. Luo, C.-C., W.-H. Li, M. N. Moore, and L. Chan. 1986. Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family. *Journal of Molecular Biology* 187:325-340.
15. Fitch, W. M. 1977. PHYLOGENIES CONSTRAINED BY THE CROSSOVER PROCESS AS ILLUSTRATED BY HUMAN HEMOGLOBINS AND A THIRTEEN-CYCLE, ELEVEN-AMINO-ACID REPEAT IN HUMAN APOLIPOPROTEIN A-I. *Genetics* 86:623-644.
16. Segrest J.P, Jackson R.L, Morrisett J.D, and J. Gotto A.M. 1974. A molecular theory of lipid—protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Letters Volume* 38:247-253.
17. Segrest J.P, Garber D.W., Brouillette C.G., Harvey S.C., and A. G.M. 1994. The amphipathic alpha helix : a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv. Protein Chem.* 45:303-369.
18. Segrest, J. P., H. De Loof, J. G. Dohlman, C. G. Brouillette, and G. M. Anantharamaiah. 1990. Amphipathic helix motif: Classes and properties. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 8:103-117.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

19. Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y.V., and Anantharamaiah G.M. 1992. *The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function.* *J. Lipid Res.* 33:141-166.
20. Bolanos-Garcia V.M., Mas-Oliva J., Ramos S., and C. R. 1999. *Phase Transitions in Monolayers of Human Apolipoprotein C-I.* *J. Phys. Chem. B*:103, 6236-6242.
21. Bolaños-García V.M., Ramos S., Castillo R., Xicohtencatl-Cortes J., and M.-O. J. 2001. *Monolayers of Apolipoproteins at the Air/Water Interface.* *J. Phys. Chem. B* 105 (24):5757 -5765.
22. Campos-Teran, J., J. Mas-Oliva, and R. Castillo. 2004. *Interactions and Conformations of α -Helical Human Apolipoprotein CI on Hydrophilic and on Hydrophobic Substrates.* *The Journal of Physical Chemistry B* 108:20442-20450.
23. Rogers D.P., Roberts L.M., Lebowitz J., Datta G., Anantharamaiah G.M., Engler J.A., and Brouillette C.G. 1998. *The Lipid-Free Structure of Apolipoprotein A-I: Effects of Amino-Terminal Deletions.* *Biochemistry* 37:11714-11725.
24. Charrière, S., and P. Moulin. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte.* Springer Paris chapitre 8
25. Fournier, N., J.-L. Paul, V. Atger, A. Cogny, T. Soni, M. de la Llera-Moya, G. Rothblat, and N. Moatti. 1997. *HDL Phospholipid Content and Composition as a Major Factor Determining Cholesterol Efflux Capacity From Fu5AH Cells to Human Serum.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2685-2691.
26. Skipski, V. P. 1972. *Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism.* pp 471-583 (Nelson, G.J., Ed.) Wiley-Interscience, New-York.
27. Scanu, A. M. 1979. *The Biochemistry of Artherosclerosis,* pp 3-8. (Scanu, A.M., Ed) Marcel Dekker, New York.
28. Phillips, J. C., W. Wriggers, Z. Li, A. Jonas, and K. Schulten. 1997. *Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks.* *Biophysical Journal* 73:2337-2346.
29. Klon, A. E., J. P. Segrest, and S. C. Harvey. 2002. *Comparative Models for Human Apolipoprotein A-I Bound to Lipid in Discoidal High-Density Lipoprotein Particles* *Biochemistry* 41:10895-10905.
30. *Theoretical Biophysics Group, B. I., University of Illinois at Urbana Champaign.* <http://www.ks.uiuc.edu/Gallery/Science/Structure/>.
31. MEAD, J. R., S. A. IRVINE, and D. P. RAMJI. 2002. *Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease.* *J Mol Med* 80:753-769.
32. Anantharamaiah, G. M., Y. V. Venkatachalapathi, C. G. Brouillette, and J. P. Segrest. 1990. *Use of synthetic peptide analogues to localize lecithin:cholesterol acyltransferase activating domain in apolipoprotein A-I.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 10:95-105.
33. Braschi, S., T. A. M. Neville, M.-C. Vohl, and D. L. Sparks. 1999. *Apolipoprotein A-I charge and conformation regulate the clearance of reconstituted high density lipoprotein in vivo.* *J. Lipid Res.* 40:522-532.
34. Brewer H.B, J., Fairwell T., LaRue A., Ronan R., Houser A., and Bronzert T.J. 1978. *The amino acid sequence of human apoA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*:623-630.
35. Franck, P. G., and Y. L. Marcel. 2000. *Apolipoprotein AI : Structure-Fonction Relationship.* 41:853-872.
36. Bolaños-García V.M., Soriano-García M., and Mas-Oliva J. 1997. *CETP and exchangeable apoproteins: Common features in lipid binding activity.* *Molecular and Cellular Biochemistry* 175:1–10, 1997.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

37. Borhani, D. W., D. P. Rogers, J. A. Engler, and C. G. Brouillette. 1997. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:12291-12296.
38. Borhani D.W., Engler J.A., and Brouillette C.G. 1999. Crystallization of truncated human apolipoprotein A-I in a novel conformation. *Acta Cryst. D*55:1578-1583.
39. D.L. Sparks, S. L.-k., and M.C. Phillips. 1992. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 267:25839-25847.
40. Jonas, A., K. E. Kezdy, and J. H. Wald. 1989. Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. *J. Biol. Chem.* 264:4818-4824.
41. Palgunachari M.N., Mishra V.K., Lund-Katz S., Phillips M.C., Adeyeye S.O., Alluri S., Anantharamaiah G.M., and Segrest J.P. 1996. Only the Two End Helixes of Eight Tandem Amphipathic Helical Domains of Human Apo A-I Have Significant Lipid Affinity : Implications for HDL Assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:328-338.
42. Frank P. G., N'Guyen D., Franklin V., Neville T., Desforges M., Rassart E., Sparks D.L., and Marcel Y.L. 1998. Importance of central alpha-helices of human apolipoprotein A-I in the maturation of high-density lipoproteins. *Biochemistry* 37:13902–13909.
43. Sparks D.L., Lund-katz S., and Phillips M.C. 1992. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 267:25839-25847.
44. Gursky O., and Atkinson D. 1996. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-I: implications for a lipid-free molten globular state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2991–2995.
45. Pownall H.J., Massey J.B., Kusserow S.K., and Gotto A.M. Jr. 1978. Kinetics of lipid-protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high density lipoproteins with phosphatidylcholines. *Biochemistry* 17:1183–1188.
46. Segall, M. L., P. Dhanasekaran, F. Baldwin, G. M. Anantharamaiah, K. H. Weisgraber, M. C. Phillips, and S. Lund-Katz. 2002. Influence of apoE domain structure and polymorphism on the kinetics of phospholipid vesicle solubilization. *J. Lipid Res.* 43:1688-1700.
47. Tricerri, M. A., A. K. Behling Agree, S. A. Sanchez, and A. Jonas. 2000. Characterization of Apolipoprotein A-I Structure Using a Cysteine-Specific Fluorescence Probe. *Biochemistry* 39:14682-14691.
48. Fang, Y., O. Gursky, and D. Atkinson. 2003. Structural Studies of N- and C-Terminally Truncated Human Apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 42:6881-6890.
49. Davidson, W. â. S., T. Hazlett, W. W. Mantulin, and A. Jonas. 1996. The role of apolipoprotein AI domains in lipid-binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13605-13610.
50. Roberts, L. M., M. J. Ray, T.-W. Shih, E. Hayden, M. M. Reader, and C. G. Brouillette. 1997. Structural Analysis of Apolipoprotein A-I: Limited Proteolysis of Methionine-Reduced and -Oxidized Lipid-Free and Lipid-Bound Human Apo A-I. *Biochemistry* 36:7615-7624.
51. Rogers, D. P., C. Brouillette, J. Engler, S. Tendian, L. Roberts, V. Mishra, G. Anantharamaiah, S. Lund-Katz, M. Phillips, and M. Ray. 1997. Truncation of the Amino Terminus of Human Apolipoprotein A-I Substantially Alters Only the Lipid-Free Conformation. *Biochemistry* 36:288-300.
52. Saito H., Lund-Katz S., and Phillips M.C. 2004. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins (Review). *Progress in Lipid Research* 43:350–380.

Chapitre 1 – Les apolipoprotéines échangeables et leur contexte biologique

53. Silva, R. A. G. D., G. M. Hilliard, J. Fang, S. Macha, and W. S. Davidson. 2005. A Three-Dimensional Molecular Model of Lipid-Free Apolipoprotein A-I Determined by Cross-Linking/Mass Spectrometry and Sequence Threading. *Biochemistry* 44:2759-2769.
54. Ajees, A. A., G. M. Anantharamaiah, V. K. Mishra, M. M. Hussain, and H. M. K. Murthy. 2006. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: Insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2126-2131.
55. Davidson, W. S., K. Arnvig-McGuire, A. Kennedy, J. Kosman, T. L. Hazlett, and A. Jonas. 1999. Structural Organization of the N-Terminal Domain of Apolipoprotein A-I: Studies of Tryptophan Mutants. *Biochemistry* 38:14387-14395.
56. Beckstead, J. A., B. L. Block, J. K. Bielicki, C. M. Kay, M. N. Oda, and R. O. Ryan. 2005. Combined N- and C-Terminal Truncation of Human Apolipoprotein A-I Yields a Folded, Functional Central Domain. *Biochemistry* 44:4591-4599.
57. Saito, H., P. Dhanasekaran, D. Nguyen, P. Holvoet, S. Lund-Katz, and M. C. Phillips. 2003. Domain Structure and Lipid Interaction in Human Apolipoproteins A-I and E, a General Model. *J. Biol. Chem.* 278:23227-23232.
58. Gorshkova, I. N., T. Liu, V. I. Zannis, and D. Atkinson. 2002. Lipid-Free Structure and Stability of Apolipoprotein A-I: Probing the Central Region by Mutation. *Biochemistry* 41:10529-10539.
59. Mishra, V. K., M. N. Palgunachari, G. Datta, M. C. Phillips, S. Lund-Katz, S. O. Adeyeye, J. P. Segrest, and G. M. Anantharamaiah. 1998. Studies of Synthetic Peptides of Human Apolipoprotein A-I Containing Tandem Amphipathic α -Helices. *Biochemistry* 37:10313-10324.
60. Okon M., Frank P.G., Marcel Y.L., and Cushley R.J. 2002. Heteronuclear NMR studies of human serum apolipoprotein A-I. Part I. Secondary structure in lipid-mimetic solution. *FEBS lett.* Apr 24; 517:139-143.
61. Saito, H., P. Dhanasekaran, D. Nguyen, E. Deridder, P. Holvoet, S. Lund-Katz, and M. C. Phillips. 2004. α -Helix Formation Is Required for High Affinity Binding of Human Apolipoprotein A-I to Lipids. *J. Biol. Chem.* 279:20974-20981.
62. Derksen, A., D. Gantz, and D. M. Small. 1996. Calorimetry of apolipoprotein-AI binding to phosphatidylcholine-triolein-cholesterol emulsions. *Biophys. J.* 70:330-338.
63. Brewer, H. B., S. E. Lux, R. Ronan, and K. M. John. 1972. Amino Acid Sequence of Human apoLp-Gln-II (apoA-II), an Apolipoprotein Isolated from the High-Density Lipoprotein Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69:1304-1308.
64. Vadiveloo, P. K., C. M. Allan, B. J. Murray, and N. H. Fidge. 2002. Interaction of apolipoprotein AII with the putative high-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* 32:9480-9485.
65. Kumar M.S., Carson M., Hussain M.M., and Murthy H.M.K. 2002. Structures of apolipoprotein A-II and a lipid surrogate complex provide insights into apolipoprotein-lipid interactions. *Biochemistry* 41:11681-11691

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES -

Mesures aux interfaces

Le premier modèle de membrane biologique fut développé par I. Langmuir dans les années 1930. Ses études sur des films d'huile à la surface de l'eau (1) l'ont amené à formuler une théorie générale sur la chimie des surfaces qui lui a valu le prix Nobel de Chimie en 1932. Avec sa collaboratrice K. B. Blodgett, ils introduisent la notion de monocouche, film interfacial dont l'épaisseur est d'un atome ou d'une molécule, et qui possède des propriétés thermodynamiques bidimensionnelles (2, 3). Nous avons utilisé ce modèle de membranes biologiques parce qu'il possède deux intérêts importants : d'une part, une géométrie simple qui permet une analyse plus facile de l'interaction protéine - lipides et d'autre part, la possibilité de réaliser des mesures expérimentales sur différentes échelles spatiales.

En ce qui concerne le travail présenté ici, les monocouches sont réalisées à la surface d'une cuve en téflon, nommée également cuve de Langmuir (voir figure 1). Les protéines étudiées sont des molécules amphiphiles qui s'adsorbent naturellement à une interface hydrophile/hydrophobe. Deux types d'interface hydrophile/hydrophobe sont prises en compte : l'interface liquide/air et l'interface liquide/lipide (voir figure 2). L'interface liquide/lipide est créée par dépôt d'un volume de phospholipides sur la surface de la cuve. Ces molécules qui comportent une structure majoritairement hydrophobe, restent confinées à la surface de la cuve. L'utilisation de deux systèmes modèles - film pur de protéines et film mixte de protéines et lipides - a pour objectif d'étudier le comportement interfacial de la protéine dans un système dont la complexité est graduelle.

Au cours de la cinétique d'adsorption de la protéine à l'interface, des mesures de la pression de surface et de la variation de l'angle ellipsométrique sont réalisées, ainsi que des mesures de spectroscopie infrarouge de type PM-IRRAS. Lorsque la pression se stabilise, le système atteint son état d'équilibre thermodynamique et un prélèvement est alors effectué sur

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

la monocouche par la méthode de Langmuir-Blodgett. Cette méthode consiste à transférer le film sur un substrat solide afin de le caractériser à l'échelle du nm par la microscopie à force atomique (AFM). L'ensemble des techniques permettant de caractériser le film sont décrites dans la suite de ce chapitre.

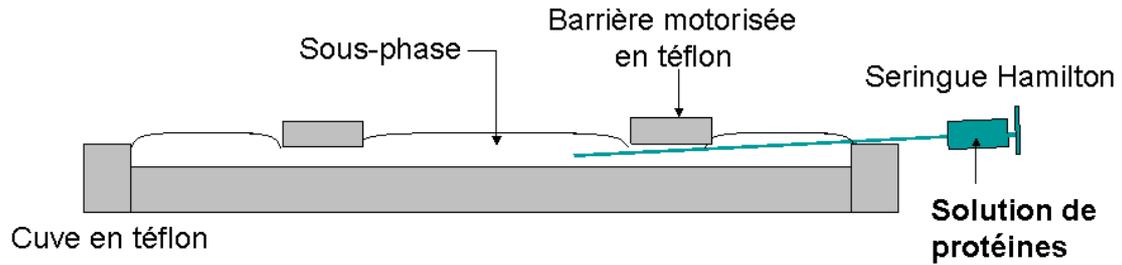


Figure 1 – Mode de préparation des films aux interfaces.

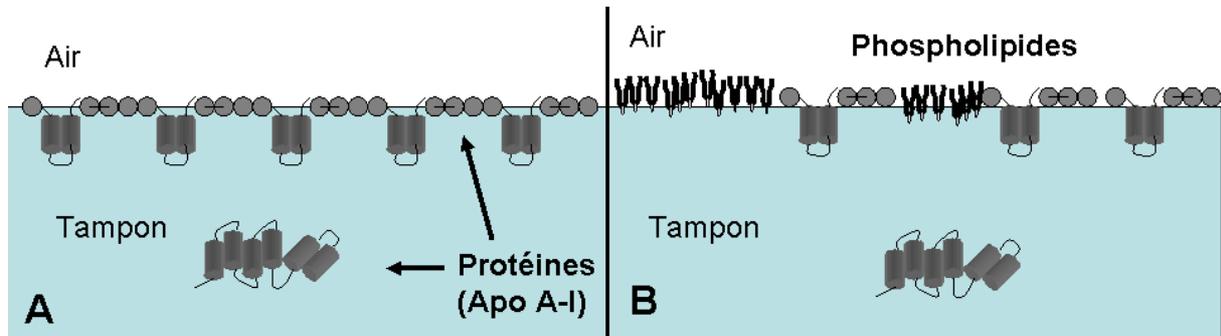


Figure 2 – Représentation schématique des différentes interfaces :
liquide/air (A) et liquide/lipides (B).

I. Principe des mesures tensiométriques et ellipsométriques

1.1 Mesure de la pression de surface

1.1.1 Définition de la tension de surface

Au sein des liquides, les molécules exercent des forces attractives entre elles qui assurent la cohésion. Lorsqu'une molécule se situe à la surface du liquide, la somme des forces exercées sur elle résulte en une force attractive orientée vers l'intérieur du liquide. A l'équilibre, le nombre de molécules dans cette configuration sera minimal, le liquide aura donc tendance à minimiser sa surface. Ainsi lorsque les molécules se placent à l'interface en augmentant de ce fait la surface d'une quantité dA , elles produisent une augmentation de l'énergie libre dF . La quantité qui définit cette augmentation d'énergie par rapport à l'augmentation de la surface correspond à la tension superficielle γ (mN/m) et est définie par la relation suivante :

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T,V,n} \quad (\text{éq. 1})$$

où F correspond à l'énergie libre, A à l'aire occupée par l'interface et où les trois paramètres fixés sont : T (température), V (volume) et n (nombre de molécules). Nous verrons par la suite une méthode expérimentale permettant de mesurer cette tension superficielle.

1.1.2 Relation de Young et notion de mouillage

Nous pouvons représenter la tension superficielle sous la forme d'un vecteur $\gamma_{i,j}$ tangentielle à l'interface entre les matériaux i et j . Par exemple, dans le cas d'un système composé de 3 fluides différents (1, 2 et 3) non miscibles et en contact, nous obtenons la représentation vectorielle exposée sur la figure 3. Ce formalisme nous amène à la relation suivante lorsque le système est à l'équilibre, appelée loi du triangle de Neumann :

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

$$\vec{\gamma}_{1,2} + \vec{\gamma}_{2,3} + \vec{\gamma}_{3,1} = \vec{0} \quad (\text{éq. 2})$$

Avec $\gamma_{1,2}$: tension de surface entre les liquides 1 et 2, $\gamma_{2,3}$: tension de surface entre les liquides 2 et 3 et $\gamma_{3,1}$: tension de surface entre les liquides 3 et 1. Dans le cas particulier d'une goutte posée sur une surface solide (voir figure 4), nous obtenons la relation suivante, appelée **équation de Young** :

$$\gamma_{l,a} \times \cos(\theta) = \gamma_{a,s} - \gamma_{s,l} \quad (\text{éq. 3})$$

où, θ correspond à l'angle de mouillage, $\gamma_{s,l}$ à la tension de surface entre le solide et le liquide, $\gamma_{l,a}$ à la tension de surface entre le liquide et l'air et $\gamma_{a,s}$ à la tension de surface entre l'air et le solide.

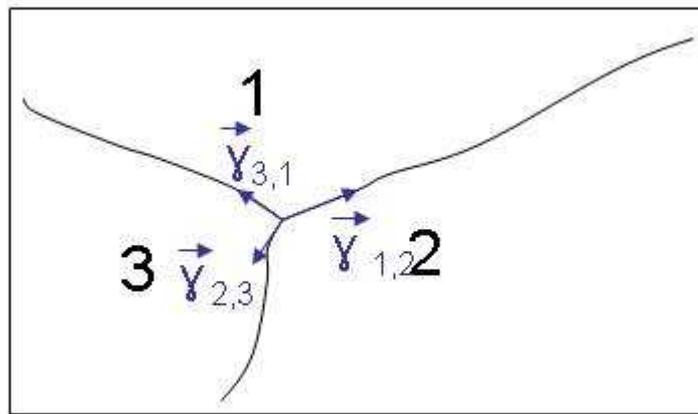


Figure 3 - Système à l'équilibre de 3 fluides en contact.

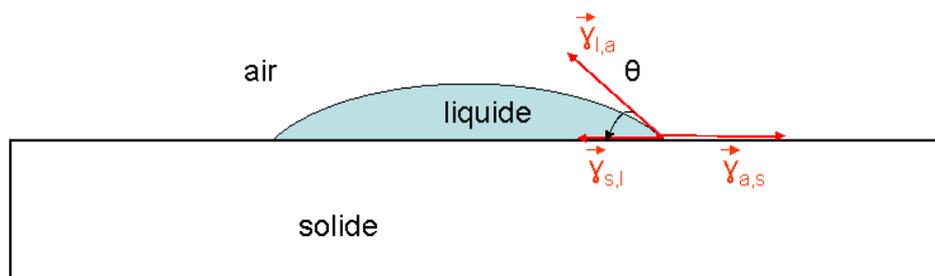


Figure 4 - Angle de mouillage θ d'une goutte sur une surface solide.

1.1.3 Méthode de la lame de Wilhelmy

La tension superficielle est mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy. Ce système comporte dans notre cas un papier filtre vertical (pour d'autres dispositifs il s'agit d'une lame en platine), dont une faible portion est immergée dans le liquide. Ce papier filtre est relié à un capteur électronique par l'intermédiaire de crochets (figure 5). Le capteur électronique permet ainsi de mesurer la force interfaciale s'exerçant sur le papier. Le papier a dans notre cas une largeur l de 1 cm, une épaisseur e d'environ 0.5 mm et une longueur L de 2.5 cm. La précision sur ce dernier paramètre n'a pas d'influence sur la mesure de la tension superficielle, contrairement à la précision sur la longueur et l'épaisseur.

La résultante \mathbf{F} des forces s'exerçant sur le papier s'écrit de la façon suivante :

$$\vec{F} = \vec{P} + \vec{P}_A + \vec{f}_{\text{interf}} \quad (\text{éq. 4})$$

où, \mathbf{P} correspond au poids du papier, \mathbf{P}_A à la poussée d'Archimède et $\mathbf{f}_{\text{interf}}$ à la force créée par la tension de surface.

La force interfaciale s'exerçant sur le capteur est créée par la remontée du liquide sur le papier (le ménisque). La valeur de cette force lorsque le papier est à l'état d'équilibre dépend de la différence entre la tension superficielle de l'interface papier/air et la tension superficielle de l'interface papier/liquide. Cette force dépend également du périmètre du papier, soit de la valeur $2(l+e)$, puisque ce contour délimite le front du liquide et de l'angle de mouillage θ . Ainsi, selon l'équation de Young (voir équation 3), nous obtenons l'expression suivante pour la force interfaciale $\mathbf{f}_{\text{interf}}$:

$$\vec{f}_{\text{interf}} = -\gamma_{l,a} \cdot \cos(\theta) \cdot 2 \cdot (l + e) \vec{u}_z \quad (\text{éq. 5})$$

La projection F_Z sur l'axe vertical de la résultante des forces s'exerçant sur le papier s'écrit donc :

$$F_Z = P + P_A - \gamma_{l,a} \cdot \cos(\theta) \cdot 2 \cdot (l + e) \quad (\text{éq. 6})$$

Comme P et P_A sont identiques à l'interface eau/air et à l'interface film/air, alors nous pouvons mesurer la variation de la force ΔF_Z créée sur le papier par la présence du film.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

$$\begin{aligned}\Delta F_Z &= F_Z^{film} - F_Z^{eau} \\ &= (\gamma_{eau,a} - \gamma_{film,a}) \cdot \cos(\theta) \cdot 2 \cdot (l + e)\end{aligned}\quad (\text{éq. 7})$$

où, F_Z^{eau} et F_Z^{film} sont respectivement la projection sur z de la force créée par l'eau et celle créée par le film sur le papier, $\gamma_{film,a}$ et $\gamma_{eau,a}$ sont respectivement les tensions de surface des interfaces film/air et eau/air.

Le papier filtre est totalement mouillant, donc nous obtenons un angle θ égal à 0. Comme de plus nous connaissons la largeur l et l'épaisseur e du papier, nous pouvons donc obtenir la différence entre les tensions de surface créées par l'eau pure et par le film, d'après l'équation suivante (équation 8). Cette différence est définie comme la **pression de surface π** créée par le film.

$$\pi = \gamma_{eau,a} - \gamma_{film,a} = \frac{F_Z^{film} - F_Z^{eau}}{2 \cdot (l + e)} \quad (\text{éq. 8})$$

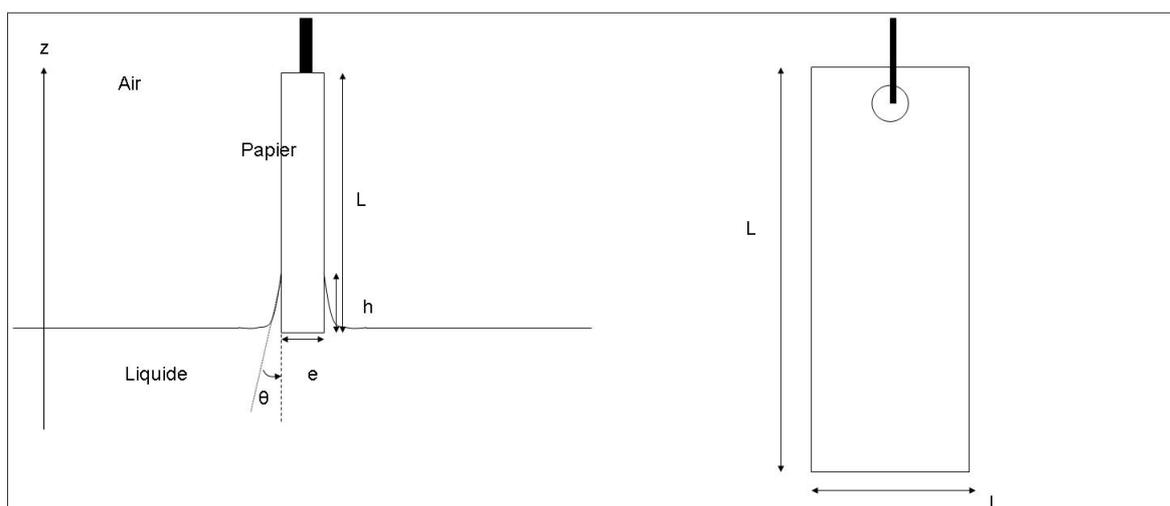


Figure 5 - Schéma d'une lame de Wilhelmy, vue de profil, la lame est immergée dans un liquide, et vue de face.

1.2 L'ellipsométrie

1.2.1 Réflectivité de la lumière par une interface

Dans le cas d'une interface d'épaisseur nulle, c'est à dire en l'absence de molécules se situant à l'interface liquide/air et dans le cas où cette interface est éclairée par une onde plane dont la longueur d'onde est supérieure aux distances entre les molécules d'eau, nous pouvons considérer que cette interface est une interface de Fresnel. Ainsi, la trajectoire du faisceau laser, qui est contenue dans le plan d'incidence, est régie par les lois de Snell-Descartes (figure 6), d'une part le faisceau laser incident forme un angle θ_i avec la normale à la surface qui est égal à l'angle θ_r formé par le faisceau réfléchi, d'autre part l'onde transmise forme un angle θ_t avec la normale tel que $n_{\text{air}} \cdot \sin(\theta_i) = n_{\text{eau}} \cdot \sin(\theta_t)$, où n_{air} et n_{eau} sont les indices de réfraction respectivement de l'air et de l'eau.

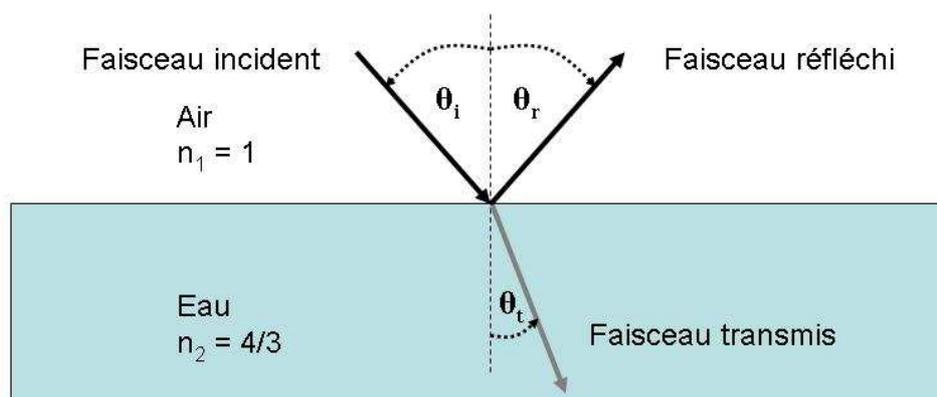


Figure 6 - Schéma de la réflexion et de la transmission d'un faisceau laser par une interface.

1.2.2 Principe général de l'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique optique d'analyse de surface, non destructrice, qui est fondée sur la mesure du changement de polarisation d'un faisceau laser créée par sa réflexion sur une surface plane (voir figure 7).

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

Une surface plane peut-être caractérisée par ses coefficients de réflexion et de transmission, qui sont des nombres complexes, et qui correspondent au rapport de l'amplitude de l'onde réfléchie ou de l'onde transmise sur l'amplitude de l'onde incidente. Les équations suivantes (équations 9 et 10) définissent les coefficients de réflexion pour les composantes du champ électrique parallèle (p) et perpendiculaire (s) au plan d'incidence :

$$r_p = \frac{E_{pr}}{E_{pi}} = |r_p| \cdot \exp(j\delta_p) \quad (\text{éq. 9})$$

$$r_s = \frac{E_{sr}}{E_{si}} = |r_s| \cdot \exp(j\delta_s) \quad (\text{éq. 10})$$

où r_p et r_s sont les modules des coefficients des composantes respectivement parallèle et perpendiculaire, tandis que δ_p et δ_s sont les déphasages des coefficients des composantes respectivement parallèle et perpendiculaire. En pratique, nous mesurons le rapport entre ces deux coefficients, aussi nommé ellipticité ρ , qui s'écrit sous la forme suivante :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan \psi \cdot \exp(j\Delta) \quad (\text{éq. 11})$$

$$\text{avec} \quad \tan \psi = \left| \frac{r_p}{r_s} \right|$$

$$\text{et} \quad \Delta = \arg|\rho| = \delta_p - \delta_s$$

où Δ correspond au déphasage entre les composantes p et s après réflexion et ψ correspond au rapport des modules des coefficients de réflexion p et s. Ces deux paramètres sont les paramètres ellipsométriques et sont mesurés grâce au dispositif expérimental qui est décrit dans la suite (voir section 1.3).

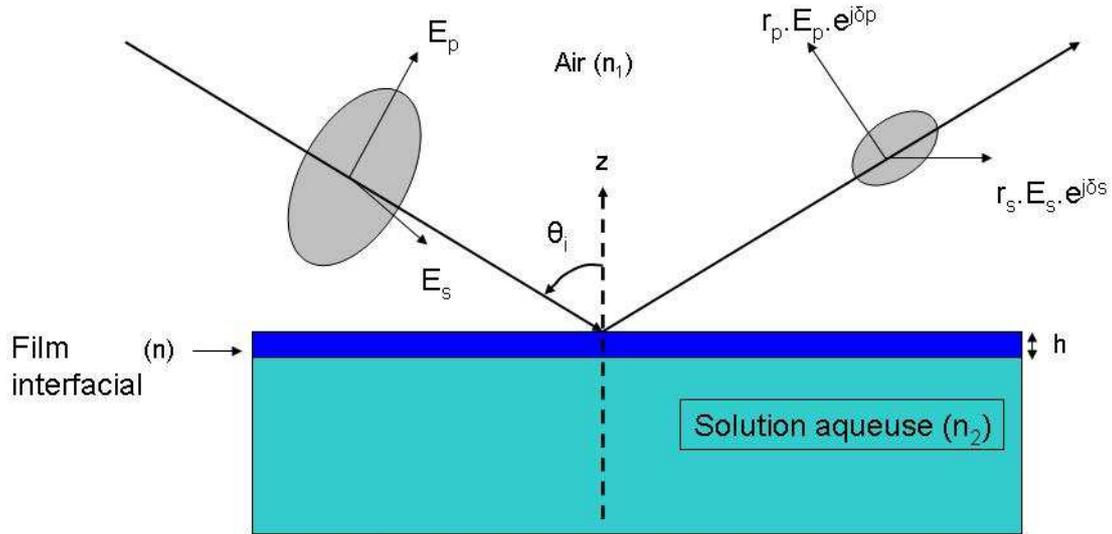


Figure 7 – Schéma de principe du déphasage d'une onde par une surface de Langmuir.

1.2.3 Cas particulier de l'angle de Brewster

Dans le cas d'une interface de Fresnel, les coefficients de réflexion, pour les deux composantes, sont des nombres réels et sont déduits de la condition de continuité de la composante tangentielle du champ électrique et du champ magnétique à travers l'interface. Ces coefficients s'expriment sous la forme suivante :

$$r_p = \frac{n_2 \cdot \cos(\theta_i) - n_1 \cdot \cos(\theta_t)}{n_1 \cdot \cos(\theta_i) + n_2 \cdot \cos(\theta_t)} \quad (\text{éq. 12})$$

$$r_s = \frac{n_1 \cdot \cos(\theta_i) - n_2 \cdot \cos(\theta_t)}{n_1 \cdot \cos(\theta_i) + n_2 \cdot \cos(\theta_t)} \quad (\text{éq. 13})$$

où θ_i, θ_r et θ_t sont définis sur la figure 6.

Ainsi, pour une onde électromagnétique incidente, il existe une valeur de l'angle d'incidence où le coefficient de réflexion de la composante en p est théoriquement nul (r_p=0), donc l'onde réfléchi par la surface sera entièrement polarisée en s. Dans ce cas là, l'angle d'incidence et l'angle de transmission vérifient, d'après les lois de Snell-Descartes, la relation suivante : θ_i + θ_t = π/2. Nous obtenons alors la relation qui suit (équation 14), indiquant la

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

valeur de l'angle d'incidence pour laquelle l'intensité sur la composante p du faisceau réfléchi est nulle. Cet angle est nommé **angle de Brewster** et noté θ_B :

$$\tan(\theta_B) = \frac{n_2}{n_1} \quad (\text{éq. 14})$$

où, n_1 et n_2 sont les indices de réfraction respectifs du milieu où se propage le faisceau incident et du milieu où se propage le faisceau transmis. Pour une interface air/eau : $\theta_B = 53^\circ 12'$. Si l'on trace les variations des coefficients de réflexion r_p et r_s en fonction de l'angle d'incidence θ_i (d'après les équations 12 et 13), on vérifie qu'à l'angle de Brewster θ_B , le coefficient r_p s'annule (voir figure 8).

Lorsque des molécules s'adsorbent à la surface de la cuve, elles créent une interface d'épaisseur non nulle. L'intensité de la composante p du faisceau réfléchi n'est plus égale à 0 et nous pourrons alors la détecter. L'angle de Brewster permet ainsi de s'affranchir du signal lumineux produit par l'eau lorsqu'on éclaire la surface de la cuve et permet d'obtenir un signal dont l'intensité est proportionnelle au carré de l'épaisseur de la couche. Dès lors, nous ne sommes plus dans le cas d'une interface de Fresnel. Par ellipsométrie nous allons mesurer l'augmentation du déphasage entre la composante p et la composante s créée par la réflexion sur le film, ce qui exige une intensité suffisante sur cette composante p et donc de décaler l'angle d'incidence d'un degré par rapport à l'angle de Brewster : $\theta_i = \theta_B - 1$.

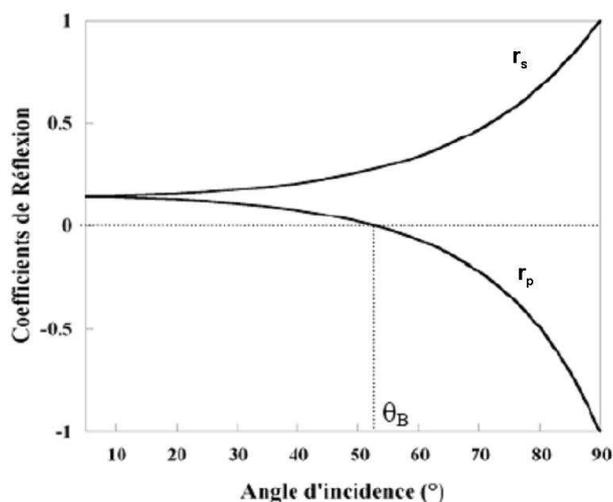


Figure 8 - Variations des coefficients de réflexion r_p et r_s en fonction de l'angle d'incidence.

1.2.4 Calcul de la concentration surfacique Γ d'un film adsorbé

Habituellement une fois les paramètres ψ et Δ mesurés, l'indice de réfraction n et la hauteur moyenne h de la monocouche doivent être obtenus en recalculant ψ et Δ à partir de valeurs arbitraires de n et h qui sont insérées dans les expressions des coefficients de réflexion r_p et r_s . Ensuite n et h sont ajustés jusqu'à obtenir des valeurs de ψ et Δ qui sont égales à celles qui ont été mesurées. Lorsque les valeurs de n et h sont obtenues, on peut alors calculer la concentration par unité de surface dans le film adsorbé à la surface de la cuve (4). Pour cela, nous allons utiliser la convention de Gibbs. Cette convention consiste à relier la quantité de matière par unité de surface Γ au sein du film à l'augmentation de la concentration en molécules $\Delta C(z)$ lorsque l'on se rapproche de l'interface, selon l'équation suivante :

$$\Gamma = \int_0^{+\infty} \Delta c(z) dz \quad (\text{éq. 15})$$

Ensuite, nous devons formuler une hypothèse, sur la variation de la concentration en fonction de l'éloignement par rapport à l'interface. Ainsi, l'excès de concentration dans le film, par rapport à la concentration en sous-phase, est considéré comme étant proportionnel à l'éloignement par rapport à l'interface. Nous pouvons alors obtenir la relation suivante entre la quantité de matière par unité de surface et les mesures de n et h :

$$\Gamma = \frac{h \cdot (n - n_2)}{a} \quad (\text{éq. 16})$$

où a correspond à l'incrément de l'indice de réfraction de la solution et n_2 à l'indice de réfraction de la solution.

Cependant, la faible résolution expérimentale sur le paramètre ψ , nous inflige une grande incertitude sur les paramètres n et h , pour des couches dont l'épaisseur est inférieure à 100 Å. Ainsi, nous utilisons une méthode alternative. En effet, une relation linéaire a été observée entre Γ et Δ à l'interface liquide/air pour la Kappa-caséine (4). Cette relation linéaire nous donne **un coefficient de proportionnalité que nous pouvons appliquer à nos mesures ellipsométriques**, selon la relation suivante :

$$\Gamma = 0.20 \cdot \Delta \quad (\text{éq. 17})$$

où Γ s'exprime en mg/m^2 et Δ en $^\circ$.

1.3 Dispositif expérimental

La cuve de Langmuir utilisée est une cuve en téflon de 716 cm² de surface (Nima technology Ltd., Angleterre), munie d'un fond en verre de 2 mm d'épaisseur permettant ainsi de diminuer le volume de la sous-phase, et donc de limiter la quantité de protéine utilisée (voir photographie sur figure 10). Cette cuve possède deux barrières mobiles en téflon qui permettent de comprimer les molécules présentes à la surface. Elle est équipée d'un capteur dédié à la mesure de la pression de surface par la méthode de la lame de Wilhelmy ainsi que d'un dispositif permettant de prélever une partie de la couche en plongeant une lame de mica dans la cuve (prélèvement de Langmuir-Blodgett, voir section 4.3 de ce chapitre). Un logiciel relié à un système électronique, tous deux fournis avec la cuve, permet d'automatiser les prélèvements tout en régulant la pression de surface.

Un ellipsomètre a été construit autour de la cuve de Langmuir. Les mesures de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique peuvent alors être acquises en même temps grâce à un logiciel réalisé au sein du laboratoire (Vincent Burgaud). Ces mesures et le prélèvement de la monocouche sont ainsi réalisés sur le même film interfacial. Une mesure est obtenue toutes les 3 ou 5 secondes. L'ellipsomètre utilisé est un ellipsomètre à annulation (5), les paramètres ellipsométriques sont obtenus pour le minimum de l'intensité du signal, ce qui permet une meilleure précision. Un faisceau laser est émis par une source He-Ne (Melles Griot) dont la longueur d'onde est $\lambda = 632.8$ nm. Le faisceau laser sonde une surface d'environ 1 mm² et une profondeur d'1 μ m. Ce faisceau est polarisé rectilignement par un polariseur P de type Glan-Thompson (Melles Griot) avant d'atteindre la surface de la cuve. La réflexion transforme alors cette polarisation rectiligne en polarisation elliptique. L'onde réfléchie passe ensuite par une lame quart d'onde, orientée de manière à ce que l'angle formé par les lignes neutres de la lame et le plan d'incidence soit de 45°. Puis l'onde passe par un analyseur A de type Glan-Thompson (Melles Griot) avant de rentrer dans le photomultiplicateur (voir figure 9).

En pratique, on constate que lorsque l'intensité du signal est minimale la position du polariseur P nous donne la valeur du paramètre ellipsométrique ψ , selon l'équation suivante (6) :

$$\Psi = P \quad (\text{éq. 18})$$

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

Ici, la référence $P = 0^\circ$ correspond au plan d'incidence. Ainsi après réflexion, la composante du champ électrique parallèle au plan d'incidence a la même amplitude que la composante perpendiculaire au plan d'incidence (voir équations 11 et 18). De ce fait, après un passage par la lame quart d'onde, nous obtenons une onde polarisée rectilignement dont l'orientation de la polarisation ne dépendra plus que du second paramètre ellipsométrique Δ . La valeur du déphasage Δ créée par l'interface entre les deux composantes de l'onde est ainsi obtenue grâce à la position de l'analyseur A, qui doit être perpendiculaire à la polarisation de l'onde afin de minimiser le signal. Nous obtenons ainsi la relation suivante (6) :

$$\Delta = 2 \cdot A \quad (\text{éq. 19})$$

Ici, la référence $A=0^\circ$ correspond à un angle de 45° entre l'analyseur et le plan d'incidence.

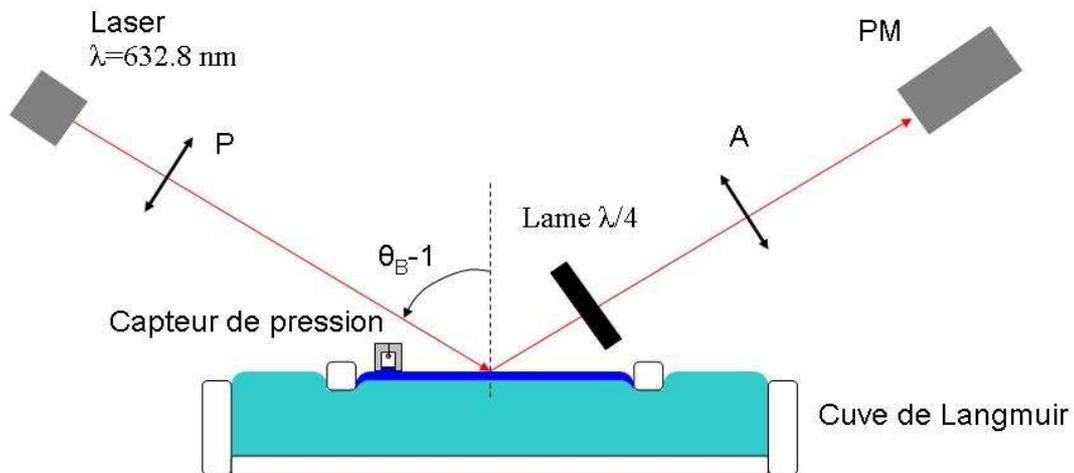


Figure 9 - Schéma du dispositif expérimental d'ellipsométrie et de tensiométrie sur cuve de Langmuir.

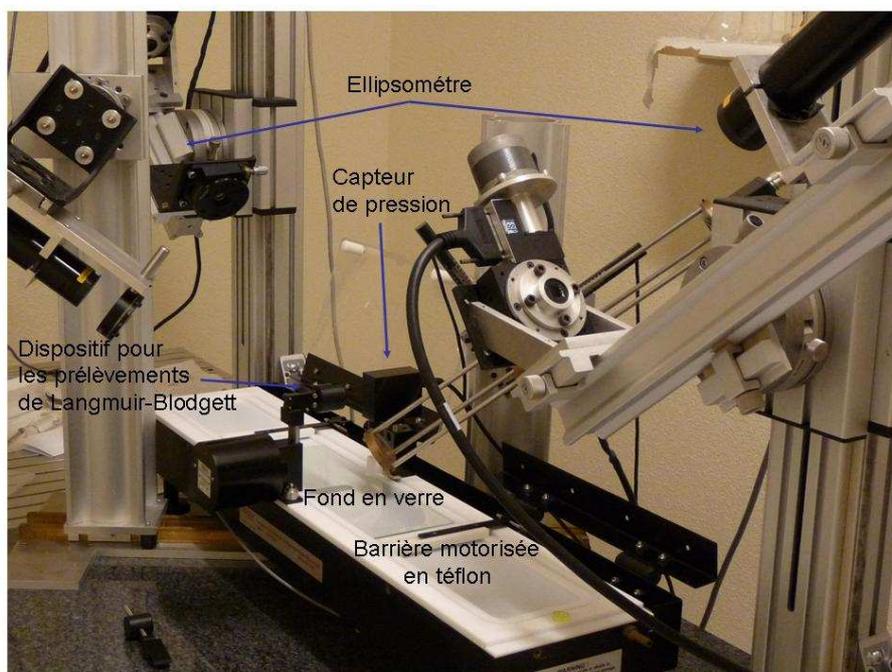


Figure 10 - Photographie de la cuve de Langmuir.

II. La spectroscopie PM-IRRAS

La spectroscopie infrarouge est une technique particulièrement intéressante pour l'étude de systèmes modélisant les membranes biologiques. Les molécules présentes dans ces modèles (protéines, phospholipides, glycolipides....) absorbent à des longueurs d'ondes appartenant à l'infrarouge, ce qui nous permet d'avoir des informations sur les domaines de vibration de leurs liaisons. De plus, cette absorption est fonction de l'orientation du moment de transition par rapport au champ électrique et nous permet ainsi d'avoir une information sur l'orientation moyenne de certains groupements d'atomes.

Nous avons vu précédemment que les films minces peuvent être utilisés comme un modèle des membranes biologiques. Aussi, l'étude des films minces a particulièrement bénéficié d'une méthode de spectroscopie nommée IRRAS (InfraRed Reflexion - Absorption Spectroscopy). Cette technique consiste à placer le film sur un substrat métallique et à utiliser l'anisotropie et l'exaltation du champ électrique, créées à la surface du métal, pour tirer des informations sur les molécules présentes dans le film. Cependant, le spectre de l'échantillon

n'étant pas normalisé en temps réel par le spectre du substrat, cette technique ne permet pas de s'affranchir des dérives temporelles et d'obtenir un signal suffisamment fort pour étudier les films ultraminces (d'épaisseur inférieure à 100 Å).

Ainsi, pour pallier ce problème, des techniques différentielles sont apparues comme la spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation - InfraRed Reflexion - Absorption Spectroscopy). Cette méthode permet d'obtenir des spectres normalisés par le spectre du substrat en temps réel, dans ce cas seules les absorptions de surface sont mises en évidence.

2.1 Principe de la spectroscopie PM-IRRAS

La **technique PM-IRRAS est issue de la technique IRRAS**, qui est une méthode de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier utilisable sur les films minces (7, 8). Différentes techniques ont été rajoutées à la spectroscopie IRRAS pour améliorer la détection du signal, d'une part en s'affranchissant des fluctuations temporelles du montage optique et de l'échantillon, d'autre part en discriminant les absorptions créées par l'échantillon des absorptions de l'environnement (9).

Ces techniques additionnelles sont premièrement, une **modulation photoélastique** qui va permettre de moduler rapidement la polarisation du champ électrique incident entre les polarisations s et p, deuxièmement, un **traitement électronique** qui va filtrer, démoduler et réaliser un traitement mathématique sur le signal reçu par le détecteur et nous permettre au final d'obtenir le signal de réflectivité différentiel normalisé :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (\text{éq. 20})$$

La spectroscopie PM-IRRAS est une technique intéressante pour l'étude sur cuve de Langmuir de l'adsorption d'une protéine à l'interface liquide/air ou de son interaction avec une couche de lipides déposée à cette interface. Tout d'abord, cette technique permet de détecter un signal avec une intensité suffisante pour des couches dont l'épaisseur est inférieure à 100 Å, ce qui est souvent le cas pour les couches mixtes protéines/phospholipides

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

que nous étudions. Ensuite, dans ces expériences, le signal que nous détectons est affranchi de l'environnement du film et permet ainsi de réaliser des expériences *in-situ*, sur une cuve de Langmuir à l'air libre. Pour finir, ce type de spectroscopie nous donne, en plus des informations sur les modes de vibrations obtenues traditionnellement par les autres types de spectroscopies infrarouges, d'autres informations concernant l'orientation des liaisons chimiques par rapport à l'interface liquide/air. Cette dernière information provient des règles de sélection de surface impliquant une relation entre l'orientation des moments de transition des modes de vibration et l'intensité et la direction des bandes correspondantes sur les spectres PM-IRRAS.

2.2 Dispositif expérimental

Le montage expérimental utilisé pour les expériences de spectroscopie PM-IRRAS est représenté sur la figure 11 (9). Ce montage comprend un spectromètre à transformée de Fourier (Nicolet 850), lui-même composé d'une source infrarouge qui émet un spectre continu dans le moyen infrarouge (de 400 à 4000 cm^{-1}) et d'un interféromètre de Michelson. L'interféromètre de Michelson permet de moduler l'intensité associée à chaque longueur d'onde du faisceau infrarouge à une fréquence temporelle différente, grâce au déplacement continu d'un miroir mobile qui modifie la longueur de résonance de la cavité au cours du temps. Nous obtenons au final un interférogramme qui est la signature de l'intensité détectée en fonction de la position du miroir mobile et dont la transformée de Fourier va donner le spectre infrarouge. Dans ces expériences nous utilisons une vitesse de 0.4747 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour le déplacement du miroir qui correspond à des fréquences de modulation variant entre 0.76 et 3.8 kHz pour un domaine de nombres d'onde compris entre 800 et 4000 cm^{-1} .

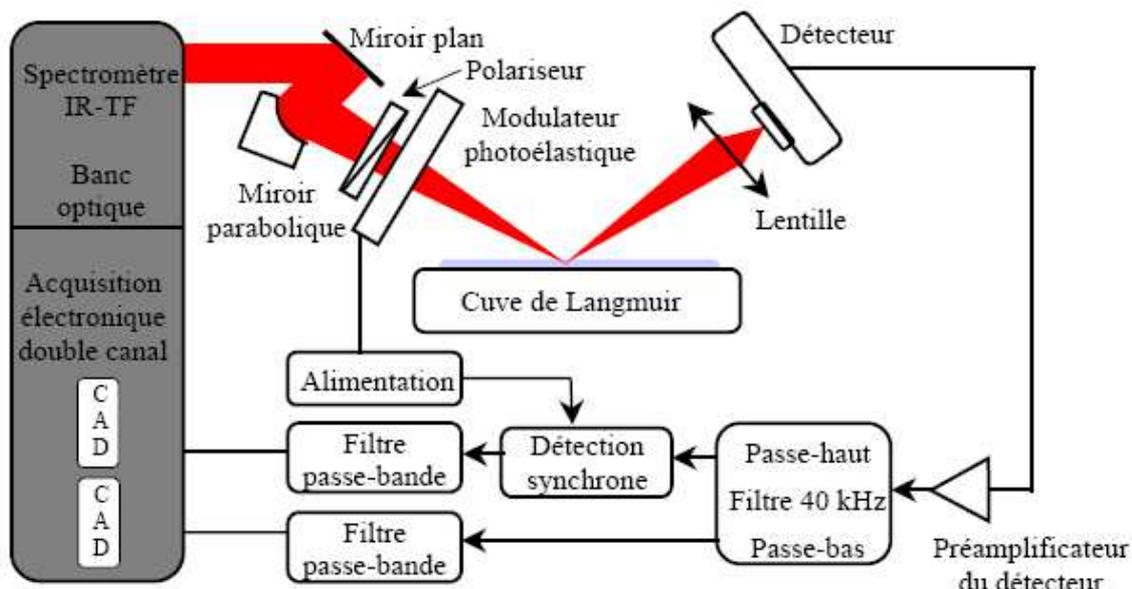


Figure 11 - Montage expérimental de la spectroscopie PM-IRRAS sur cuve de Langmuir et à l'interface liquide/air.

Les expériences sont réalisées sur cuve de Langmuir, puisque le signal PM-IRRAS s'affranchit suffisamment des absorptions provoquées par l'environnement (même si il reste sensible à l'absorption provoquée par la vapeur d'eau).

Le faisceau infrarouge est envoyé à l'extérieur du spectromètre à l'aide d'un miroir basculant, puis est réfléchi sur un miroir parabolique afin d'être focalisé sur la surface de la cuve. Avant d'atteindre la surface, le faisceau passe à travers un polariseur, qui ne laisse passer que la polarisation s du champ électrique, puis à travers un modulateur photoélastique (PEM). Le PEM est composé de quartz piézo-électriques qui vont transformer la tension sinusoïdale f_m appliquée sur le PEM en une contrainte mécanique sur un cristal de séléniure de zinc (ZnSe). La déformation du cristal le rend alors biréfringent ce qui va permettre au PEM de moduler la polarisation du faisceau infrarouge entre les polarisations linéaires s et p à une fréquence fixe $2 f_m$.

Le faisceau est ensuite réfléchi par la surface de la cuve, puis focalisé par une lentille en ZnSe sur un détecteur de type MCT, associé à un préamplificateur et refroidi à l'azote liquide (77K) pour éviter le bruit thermique (il s'agit d'un détecteur photovoltaïque utilisant des semi-conducteurs et dont l'avantage est qu'il allie une large réponse spectrale à un fort rendement optique). En fonction de l'intensité du signal, on pourra modifier l'amplification ou la fréquence de coupure du détecteur pour ajuster au mieux la dynamique du signal.

2.3 Règles de sélection à l'interface liquide/air

En spectroscopie infrarouge, l'intensité d'une bande d'adsorption associée à un mode de vibration i d'une liaison chimique donnée est proportionnelle à la quantité de molécules absorbant dans cette bande. Cependant, l'absorption liée à ce mode de vibration est également influencée par le moment de transition \mathbf{M}_i qui lui est associé et qui est défini de la façon suivante $\mathbf{M}_i = \langle \psi_{v'} | \boldsymbol{\mu}_i | \psi_v \rangle$, où $\psi_{v'}$ et ψ_v sont respectivement les fonctions d'onde des états vibrationnels inférieur et supérieur et $\boldsymbol{\mu}_i$ l'opérateur moment dipolaire associé au mode de vibration i de la liaison chimique (voir figure 12). L'absorption est ainsi fonction du terme $|\mathbf{M}_i \cdot \mathbf{E}|^2$ ou encore $|\mathbf{M}_i \cdot \mathbf{E}|^2 \cdot \cos^2(\theta)$, où θ est l'angle formé entre \mathbf{M}_i et le champ électrique excitateur \mathbf{E} . Ainsi, nous pouvons dire que **l'intensité d'une bande d'absorption est directement reliée à l'angle que fait le moment de transition avec la direction du champ électrique.**

A partir des spectres PM-IRRAS, il est donc possible de retrouver l'orientation de certains groupements d'atomes appartenant aux molécules présentes à la surface de la cuve. Grâce à des simulations de spectres PM-IRRAS (10), qui ont été réalisés sur un système modèle de film uniaxe déposé à la surface de l'eau, des règles de sélection régissant les intensités sur les bandes d'absorption ont été établies (pour ces simulations, l'eau est considérée comme non absorbante avec un indice de réfraction $n = 1.33$, l'épaisseur du film vaut 20 Å et l'angle d'incidence vaut 75°, ce qui est l'angle optimal pour le rapport signal sur bruit (9)). **Ces règles de sélection sont les suivantes (10) :**

- à un moment de transition d'un groupement moléculaire parallèle au plan de l'interface correspond une bande d'adsorption orientée vers le haut.
- à un moment de transition d'un groupement moléculaire perpendiculaire au plan de l'interface correspond une bande d'absorption orientée vers le bas.
- pour une orientation particulière du moment de transition par rapport à l'interface ($\theta \sim 40^\circ$), il y a extinction de la bande d'absorption.

Ces résultats sont représentés sur la figure 12.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

Ces résultats montrent que la direction d'une bande d'absorption associée à un mode de vibration donné sur un spectre PM-IRRAS peut-être reliée à l'orientation du moment de transition associé à ce mode et donc à l'orientation de certaines liaisons chimiques et de certains groupements atomiques. Nous allons voir par la suite des liaisons chimiques essentielles pour la spectroscopie infrarouge des protéines, qui nous permettront d'avoir accès à la conformation et à l'orientation des protéines à l'interface.

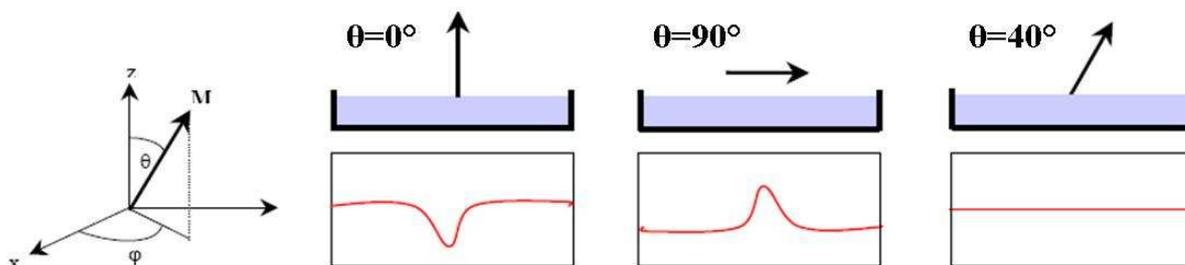


Figure 12 – Règles de sélection de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface liquide/air (9).

2.4 Spectroscopie infrarouge des protéines

La spectroscopie infrarouge est très efficace pour l'investigation de la conformation des protéines et permet notamment de quantifier la proportion des différentes structures secondaires au sein de la protéine (11-14). En effet, la spectroscopie dans le domaine de l'infrarouge moyen (de 350 cm^{-1} à 3500 cm^{-1}) donne accès aux contributions sur les modes de vibration. Ces modes de vibration mettent en jeu l'élongation symétrique ou antisymétrique des liaisons chimiques ou encore affectent les angles entre ces liaisons. Dans le cas des liaisons amides (ou liaisons peptidiques), qui sont les liaisons qui relient les acides aminés entre eux au sein de la protéine (voir figure 13), les contributions sur les modes de vibration associés à ces liaisons varient sensiblement lors des changements de conformation. De plus les bandes associées à ces modes de vibration sont souvent les plus intenses sur les spectres IR des protéines et sont donc caractéristiques de ces spectres (15).

Les modes de vibration des liaisons peptidiques peuvent être classés selon deux catégories : les modes avec une bande d'absorption de haute fréquence ($> 3000 \text{ cm}^{-1}$), qui correspondent aux modes amide A et B et ceux avec une bande d'absorption de basse fréquence ($< 1700 \text{ cm}^{-1}$), qui correspondent aux modes amide I à VII. Les modes amides A et

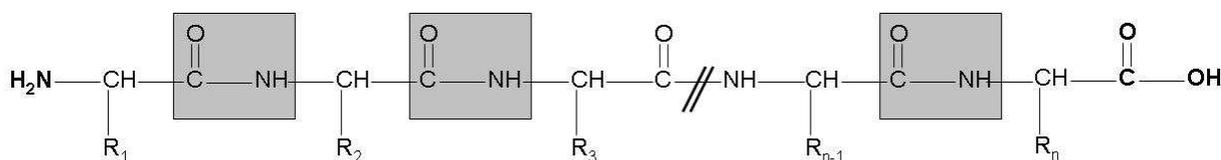
Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

B ainsi que les modes amides I à IV correspondent à des modes de vibration situés dans le plan de la liaison peptidique, tandis que les modes amides V à VII correspondent à des vibrations hors du plan.

Les modes amides I, II et III sont les modes les plus utilisés et sont représentés sur la figure 13 (16) :

- Le mode amide I est situé entre 1610 et 1700 cm^{-1} et est essentiellement dû à la vibration d'élongation sur la liaison $\text{C}=\text{O}$ (78%).
- Le mode amide II est situé entre 1510 et 1560 cm^{-1} et résulte du couplage entre la déformation angulaire de la liaison N-H dans le plan de la liaison peptidique (63%) et de l'élongation de la liaison C-N (44%).
- Le mode amide III est situé entre 1240 cm^{-1} et 1330 cm^{-1} et est également dû au couplage entre le mode d'élongation de la liaison C-N (35%) et la déformation angulaire de la liaison N-H (29%), mais sa phase est opposée à celle du mode amide II.

Parmi ces trois modes, nous n'utiliserons au cours de ce travail que les deux premiers (amide I et II), car ce sont les plus intenses.



Bandes de vibration	Description	Fréquence (cm^{-1})
Amide I		1700-1610
Amide II		1560-1510
Amide III		1310-1240

Figure 13 – Représentation des modes de vibration amide I, II et III de la liaison peptidique (16), qui est représentée en gris sur le schéma ci-dessus.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

Au sein d'une protéine, les acides aminés forment une chaîne, dont chaque maillon est relié à son prédécesseur et à son successeur par une liaison peptidique (voir figure 13). Une structure répétitive comme une hélice α ou un feuillet β est créée par l'apparition périodique de liaisons hydrogène entre les groupements C=O et N-H des acides aminés (voir chapitre 1 section 1.1.2). Ces liaisons hydrogène provoquent un couplage entre les modes de vibration amides I et II et produisent ainsi un éclatement de ces modes qui dépendra de la structure secondaire de la protéine (17).

Dans le cas d'une hélice α , les liaisons hydrogène se créent le long de la chaîne d'acides aminés, ce qui résulte en une différence de phase δ entre les vibrations associées aux liaisons amides appartenant à cette chaîne (différence de phase intrachaîne). Par contre dans le cas d'un feuillet β , les liaisons hydrogène se créent entre deux chaînes d'acides aminés différentes, ainsi il se rajoute une différence de phase δ' entre les vibrations associées aux liaisons amides sur des chaînes différentes (différence de phase interchaîne). Les fréquences expérimentales observées dans l'eau pour les modes de vibration caractéristiques de la conformation d'une protéine sont répertoriées dans le tableau 1 (18), et permettent de différencier les structures secondaires entre elles : hélices α , feuillets β parallèles ou anti-parallèles, coudes β et structures désordonnées.

Structure secondaire		Mode amide I (cm^{-1})	Mode amide II (cm^{-1})
Hélice		1662 - 1645	1548 – 1510
Feuillet	Parallèle	1637 - 1618	1524 – 1510
	Anti-parallèle	1689 - 1682 (I')	1560 -1550
		1632 - 1618 (I)	1524 – 1510
Coude		1682 - 1662	1568 – 1543
Structure désordonnée		1673 - 1645	1550 – 1535

Tableau 1 : Fréquences caractéristiques dans l'eau des modes de vibration amide I et II pour différentes conformations de protéines, d'après (18).

La proximité de ces bandes fait que le chevauchement entre elles est possible. Il faudra dans ce cas utiliser des techniques de déconvolution afin de déterminer la structure secondaire de la protéine.

Une fois la structure secondaire des chaînes d'acides aminés établie, nous pouvons déterminer l'orientation de ces chaînes. En effet, le signal PM-IRRAS théorique a été calculé

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

pour une monocouche anisotrope de polypeptides (19). Les valeurs des indices optiques anisotropes furent générées à partir de mesures expérimentales en infrarouge obtenues dans le cas d'une chaîne polypeptidique avec une structure secondaire en hélice α (20, 21). Cette simulation fut réalisée pour différentes orientations angulaires des hélices α à l'interface liquide/air, les différents spectres sont représentés sur la figure 13 (22). Ainsi, en accord avec les règles de sélection pour une interface diélectrique (23), l'intensité de la bande du mode amide I est fortement positive lorsque l'hélice est parallèle à l'interface liquide/air, alors que l'intensité sur la bande du mode amide II est nulle dans ce cas. Inversement, quand l'hélice α est perpendiculaire à l'interface liquide/air, l'intensité sur la bande associée à l'amide I est fortement négative, tandis que l'intensité sur la bande associée à l'amide II est fortement positive. De part ces deux cas extrêmes, nous pouvons, en mesurant le maximum de l'intensité sur la bande associée à l'amide I et sur la bande associée à l'amide II, puis en faisant le rapport entre ces deux maxima (RI/RII), obtenir un ratio indicatif de l'angle entre l'hélice α et le plan de la surface (voir figure 14).

Il est également possible de déterminer l'orientation des chaînes d'acides aminés pour d'autres structures secondaires que l'hélice α . Ainsi dans le cas de feuillets β anti-parallèles, la direction et l'intensité des bandes associées à l'amide I et à l'amide I' indiquent si les feuillets β et les chaînes peptidiques des feuillets sont parallèles ou perpendiculaires à l'interface (24).

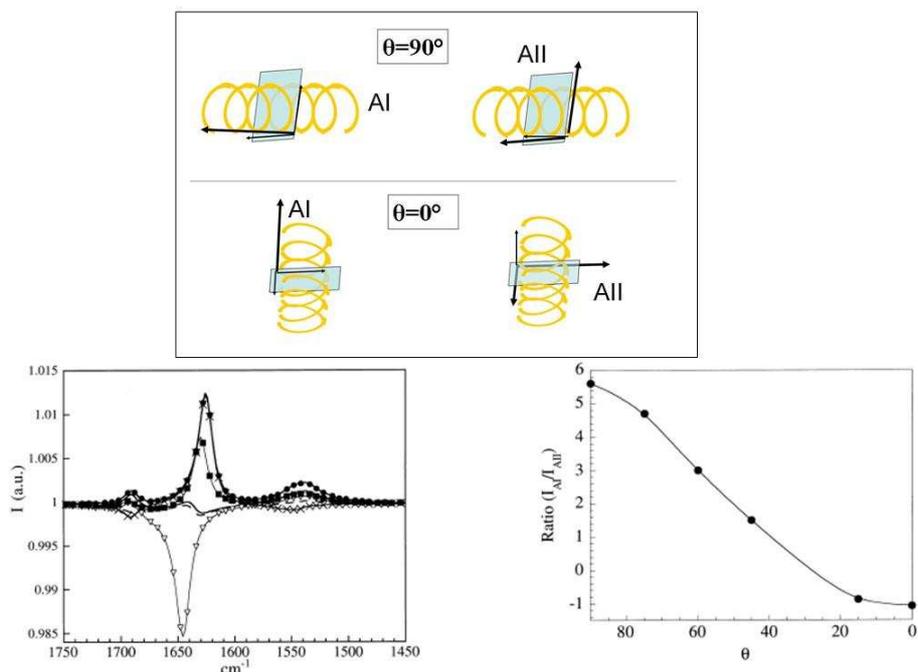


Figure 14 – Spectres simulés d'un film monomoléculaire anisotrope de polypeptides ayant une structure secondaire en hélice α (à gauche)(22) et graphe du rapport des maximums des bandes associées aux amides I et II : RI/RII (à droite) (22). L'orientation des vibrations amide I et II sur l'hélice α sont représentées sur le schéma ci-dessus.

III. Matériel biologique

3.1 Choix des concentrations en Apo A-I et Apo A-II

Quand une protéine amphiphile s'adsorbe à l'interface hydrophile/hydrophobe, elle augmente la pression de surface (respectivement, elle abaisse la tension de surface). Lorsque nous augmentons la concentration de protéines en sous-phase, la pression de surface augmente jusqu'à atteindre un seuil. Ce seuil signifie que la quantité de protéine à l'interface n'augmentera plus (voir figure 15). Dès lors, l'agrégation de la protéine en sous-phase est favorisée de la même manière que la formation de micelles est favorisée lorsque l'on dépasse la concentration micellaire critique (c.m.c) d'un surfactant. Afin de privilégier l'interaction de la protéine avec les lipides par rapport à l'interaction protéine - protéine, nous avons décidé de réaliser nos expériences à une concentration inférieure à la concentration seuil (25). Nous avons ainsi utilisé 1.5 $\mu\text{g/mL}$ d'Apo A-I en solution dans nos expériences. La figure 15 présente les valeurs de la pression de surface obtenues à l'équilibre en fonction de la concentration en Apo A-I dans la sous-phase et la figure 16 montre la cinétique à l'interface liquide/air de l'Apo A-I pour une concentration en sous-phase de 1.5 $\mu\text{g/mL}$.

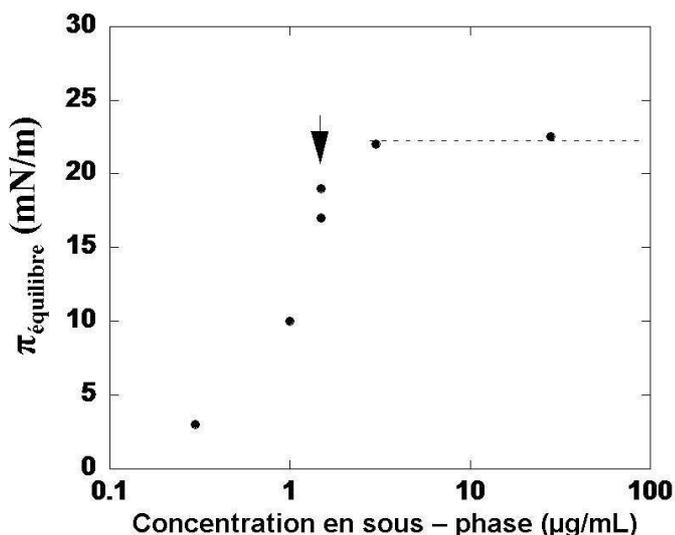


Figure 15 - Graphe de la pression de surface à l'équilibre thermodynamique lors de l'adsorption de l'Apo A-I à l'interface liquide/air en fonction de la concentration en Apo A-I dans la sous-phase.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

La flèche indique la concentration utilisée pour les expériences avec lipides.

Sous nos conditions expérimentales, l'Apo A-II existe sous forme dimérique en solution, tandis que l'Apo A-I existe sous forme monomérique. Pour une concentration massique de 0.9 $\mu\text{g/mL}$, la concentration en dimères d'Apo A-II est la même que la concentration en monomères d'Apo A-I pour une valeur de 1.5 $\mu\text{g/mL}$, elle correspond à 53.10^{-9} mol/L. En travaillant à une concentration d'Apo A-II de 0.8 $\mu\text{g/mL}$, nous économisons des aliquots de protéines, tout en restant proche de la concentration voulue en dimères avec une erreur de moins de 12 %.

Les expériences sur les Apo A-I et A-II ont donc été réalisées pour des concentrations respectives de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ et 0.8 $\mu\text{g/mL}$. Nous pourrions ainsi comparer l'interaction de ces deux protéines avec les lipides pour une même concentration en oligomères (monomères ou dimères).

V.M. Bolanos-Garcia et co-auteurs ont obtenu pour une concentration en monomères d'Apo A-I et en dimères d'Apo A-II de l'ordre 10^{-6} mol/L des pressions finales d'adsorption à l'interface liquide/air qui sont similaires et d'environ 23 mN/m (26). Pour une concentration de 53.10^{-9} mol/L (soit 1.5 $\mu\text{g/mL}$) en monomères d'Apo A-I, nous obtenons une pression finale d'adsorption de 17 mN/m. Pour cette même concentration en dimères d'Apo A-II (soit 0.8 $\mu\text{g/mL}$), nous constatons l'existence d'un premier plateau vers 9 mN/m qui n'est pas visible sur la cinétique à 10^{-6} mol/L (26), la pression évolue ensuite vers un deuxième plateau dont la pression est supérieure à 15 mN/m (voir figure 16). La vitesse avec laquelle la pression évolue vers le deuxième plateau dépend de la concentration d'Apo A-II dans la sous-phase. L'évolution vers ce deuxième plateau est également accompagnée d'un fort changement de l'angle ellipsométrique (voir figure 16) qui pourrait être provoqué par une modification de l'orientation d'une partie des hélices α des dimères d'Apo A-II, par rapport à l'interface liquide/air, comme il a été suggéré par V.M. Bolanos-Garcia et co-auteurs (27).

En réalisant des mesures sur des concentrations plus élevées (de l'ordre de 10^{-7} mol/L), nous avons constaté que les valeurs des pressions finales d'adsorption pour l'Apo A-I et l'Apo A-II évoluent vers celles obtenues par Bolanos-Garcia et co-auteurs (26).

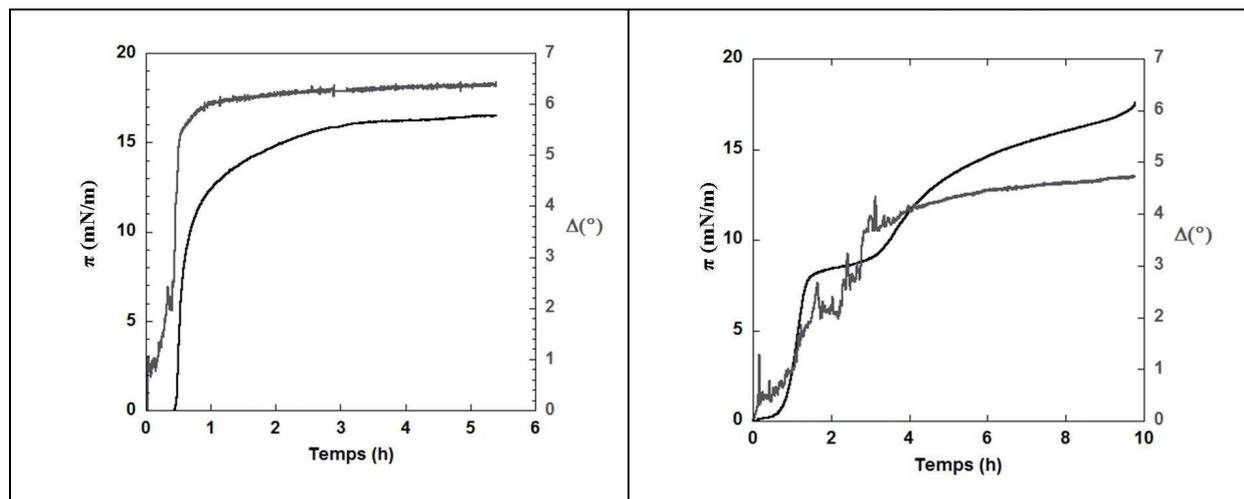


Figure 16 – Mesures de la pression de surface (traits noirs) et de l'angle ellipsométrique (traits gris) en fonction du temps pour l'Apo A-I (graphe de gauche) et pour l'Apo A-II (graphe de droite). Les concentrations en sous-phase sont de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ pour l'Apo A-I et 0.8 $\mu\text{g/mL}$ pour l'Apo A-II.

3.2 Choix des lipides

Nous allons commencer notre argumentation sur notre choix concernant les lipides par une description de l'organisation dans les monocouches lipidiques. Nous exposerons ensuite notre stratégie pour étudier séparément l'influence de l'organisation de la couche et l'influence des charges électrostatiques portées par les têtes polaires sur les interactions protéines – lipides.

3.2.1 Diagramme de phases

Si nous déposons à la surface d'une solution aqueuse une goutte d'une solution obtenue en solubilisant un phospholipide dans un solvant organique, il se forme au cours de l'évaporation une monocouche de phospholipides à l'interface liquide/air. La partie polaire du lipide est en contact avec l'eau tandis que la partie apolaire, qui est la chaîne hydrocarbonée, est en contact avec l'air. Dans une chaîne hydrocarbonée, comme celles des phospholipides, il existe une libre rotation autour des liaisons C-C. La configuration potentiellement la plus stable est la configuration *trans*. Le passage d'une configuration *trans* (*t*) à une configuration *gauche* (*g*) nécessite un faible apport d'énergie, que peut fournir l'agitation thermique. Dans une situation où toutes les liaisons C-C de la chaîne optent pour une configuration *trans*, la chaîne est étirée au maximum et nous obtenons une configuration *tout-trans* (voir figure 17).

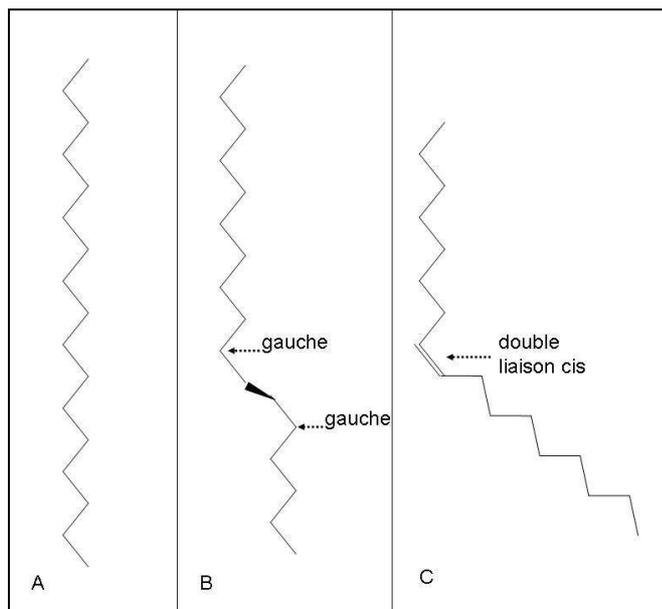


Figure 17 - Les différentes conformations d'une chaîne hydrocarbonée, en A : nous avons une configuration tout-trans, en B : nous avons une partie de la chaîne en configuration gauche (...tgtgtt...) et en C : nous avons une chaîne avec une double liaison cis.

Des diagrammes de phase complexes (pression, température), regroupant toutes les transitions de phase théoriques et expérimentales en monocouche, sont rencontrées dans la littérature (28). Cependant pour des molécules couramment utilisées en biologie, on considère que le nombre d'états physiques pour un système à deux dimensions s'élève à quatre. Les notations employées sont celles utilisées par Dervichian et Gaines (29, 30).

L'état le plus dilué est l'état gazeux, noté G, dans ce cas il y a absence d'interactions entre molécules et une désorganisation complète des chaînes aliphatiques (forte proportion de conformations gauches parmi les liaisons C-C). Au fur et à mesure que le milieu devient plus dense nous obtenons les phases liquide expansé (LE), liquide condensé (LC) puis solide (S). Dans l'état LE, les têtes polaires sont organisées dans un réseau bidimensionnel tandis que les chaînes aliphatiques restent mobiles. Lorsque les lipides passent à l'état LC, les têtes polaires se rapprochent ce qui implique le passage des chaînes aliphatiques en configuration *tout-trans* et leur impose une organisation plus ordonnée. Dans ce cas, une légère inclinaison des chaînes peut-être observée. L'état S se différencie de l'état LC, par un alignement des chaînes aliphatiques sans inclinaison.

La pression de surface, définie dans la section 1.2, est l'équivalent pour un système bidimensionnel de la pression tridimensionnelle. Elle est directement reliée à l'aire moyenne

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

A occupée par une molécule à la surface de la cuve, cette aire moyenne est définie de la manière suivante :

$$A(\text{Å}^2) = \frac{S(\text{cm}^2) \times 10^{-7}}{n(\text{mol}) \times N_{Av}} \quad (\text{éq. 21})$$

où S est la surface occupée par la couche, n est le nombre de moles de solution déposée à la surface et N_{Av} est le nombre d'Avogadro ($6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$). L'état physique d'une monocouche de lipides dépendra ainsi de la pression de surface. Plus la pression est importante et plus l'aire moyenne des molécules de la couche de lipides est faible. Ainsi, lorsque la pression est nulle, la couche de lipides est très diluée et se trouve ainsi dans une coexistence de phase LE/G. Au fur et à mesure que la pression augmente, les molécules se rapprochent et la couche passe successivement par les phases LE et LC comme il a été indiqué précédemment. Lorsque la pression continue à augmenter le système passe dans une configuration tridimensionnelle (collapse). La phase solide n'est pas observable sur une monocouche de lipides déposée à la surface d'une cuve de Langmuir à température ambiante. Sur le graphe de la pression en fonction de l'aire moyenne des molécules, nommé isotherme et présenté sur la figure 18, nous indiquons les zones d'existence de ces différentes phases, ainsi que les zones correspondant au changement de phase. L'isotherme met en évidence deux changements de phase : $G \rightarrow LE$ et $LE \rightarrow LC$, se produisant à pression constante (plateau) et correspondant donc à des transitions de phase du premier ordre.

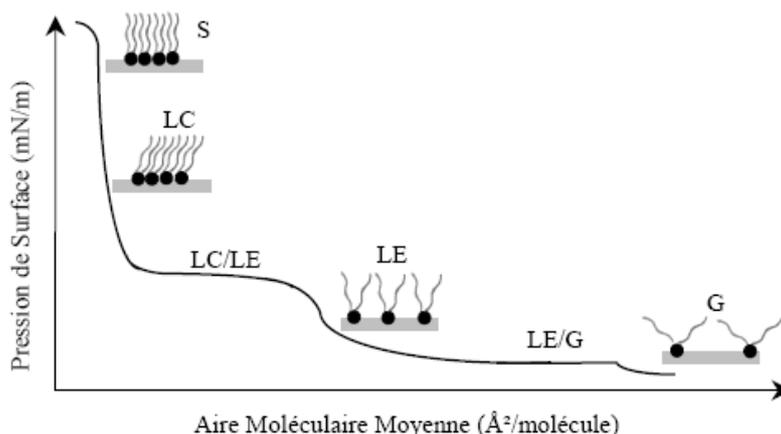


Figure 18 - Représentation d'une isotherme de compression, la pression de la couche de lipides est donnée en fonction de l'aire moléculaire moyenne. La phase et les changements de phase en fonction de la pression sont indiqués (31).

Ces changements de phase vont également dépendre de la structure du phospholipide utilisé. En effet, il existe un parallèle entre la température de fusion des acides gras formant

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

les chaînes hydrocarbonées des lipides et la température de transition de ces lipides. La diminution de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras et l'augmentation du nombre d'insaturations qu'elles portent conduit à la diminution des interactions entre ces chaînes et donc à la diminution de la température de fusion. En conséquence, si la longueur des chaînes du lipide diminue ou si le nombre d'insaturations portées par celles-ci augmente, la température de transition du lipide diminue également. De la même façon, une diminution de la longueur des chaînes hydrocarbonées va augmenter la pression de transition LE → LC du lipide et la présence d'insaturations va empêcher la formation de la phase LC (voir figure 17).

Ainsi, les différents états physiques sont essentiellement influencés par les conformations adoptées par les chaînes aliphatiques. **Le compactage des têtes polaires dépendra avant tout de la capacité de ces chaînes à s'ordonner.**

3.2.2 Etude de l'influence de la phase du lipide

Comme nous l'avons expliqué au chapitre 1 section 3.2, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont les deux principaux phospholipides présents à la surface des lipoprotéines. La présence de la sphingomyéline modifie l'organisation de la couche lipidique (rigidifie la couche) et peut créer des interactions avec les protéines qui sont différentes de celles créées par la phosphatidylcholine (groupements chimiques différents). Nous avons donc étudié l'influence de l'organisation de la couche lipidique sur l'interaction protéines – lipides, en utilisant seulement des phospholipides de type phosphatidylcholine, DPPC et DOPC. La différence dans la structure des chaînes acyl de DPPC et DOPC permet ainsi d'obtenir une organisation différente dans la couche de lipides. Le premier phospholipide, DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine), possède deux chaînes aliphatiques saturées de 16 carbones chacune, le second, DOPC (dioléoyl-phosphatidylcholine), possède deux chaînes aliphatiques ayant chacune une insaturation et 18 carbones. Les chaînes aliphatiques associées à ces deux lipides sont très fréquentes dans les membranes biologiques et peuvent représenter jusqu'à 50 % du poids total.

La présence d'une insaturation sur chaque chaîne aliphatique de DOPC empêche ce lipide d'atteindre la phase LC, même si la pression augmente. Par contre, au dessus d'une pression de 10 mN/m, la plus grande partie de DPPC sera en phase LC et à une pression de 30 mN/m, DPPC sera entièrement en phase LC. Ainsi, en comparant l'interaction de la

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

protéine avec une couche de DPPC à son interaction avec une couche de DOPC, sachant que les deux couches sont préparées à la même pression avant l'injection de la protéine, nous pouvons mettre en évidence l'existence d'un effet de phase, si il existe.

3.2.3 Etude de l'influence de la charge du lipide

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence des interactions électrostatiques entre protéines et phospholipides, en comparant les interactions que les protéines créent avec la phosphatidylcholine à celles qu'elles créent avec un phospholipide anionique. Comme nous l'avons précisé précédemment (voir section 3.2.1), la phase du phospholipide dépend avant tout de la configuration des chaînes aliphatiques. Ainsi, en modifiant le groupement alcool de la tête polaire, nous modifions la charge portée par cette tête (voir chapitre 1, section 3.1) tout en conservant un diagramme de phase similaire. Nous avons donc utilisé DPPC, qui possède un groupement phosphatidylcholine, et un autre phospholipide, DPPG (dipalmitoyl-phosphatidylglycérol), où le groupement glycérol remplace le groupement choline. Ainsi, DPPC possède une tête polaire zwitterionique (cette tête forme un dipôle et sa charge est donc globalement neutre) tandis que DPPG possède une tête polaire anionique (chargé négativement). En comparant l'interaction de la protéine avec une couche de DPPC à son interaction avec une couche de DPPG, sachant que les deux couches ont la même pression initiale avant l'injection de la protéine, nous pouvons mettre en évidence l'existence d'un effet de charge, si il existe.

3.3 Matériel utilisé

3.3.1 Expression et purification des Apo A-I et A-II et des fragments de la dystrophine

L'expression et la purification des apolipoprotéines furent réalisées par Victor M. Bolanos-Garcia (Département de Biochimie de l'université de Cambridge). L'expression et la purification des fragments de la dystrophine ont été réalisées par E. Le Rumeur et S. Legardinier (Equipe « RMN et interactions Lipides – Protéines » de l'UMR CNRS – 6026) (32, 33). Toutes ces protéines ont été exprimées dans E. Coli (cellule hôte). Les

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

apolipoprotéines sont exprimées avec un tag histidine et sont purifiées sur colonne Ni-NTA, après dénaturation. Après leur passage sur cette colonne, les apolipoprotéines sont diluées un court moment dans un tampon TBS (20 mM Tris et 200 mM NaCl, pH 8.0), pour retrouver leur repliement natif. Les fragments de la dystrophine sont exprimés avec un tag GST et purifiés sur une colonne appropriée à ce tag.

La purification de ces protéines s'achève par un passage sur une colonne échangeuse d'ions ou sur une colonne pour filtration par gel. Après vérification de leur identité et de leur pureté (spectrométrie de masse, vérification de la séquence de la partie N-terminal, SDS-PAGE...), ces protéines sont stockées dans un tampon approprié, à -20°C. Un protocole plus détaillé est donné en annexes pour l'Apo A-I (Voir annexe 1).

3.3.2 Tampon pour les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont solubilisées dans un tampon aqueux de pH 7.0 +/- 0.1 avec une concentration de 20 mM en ions phosphate (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄). L'eau utilisée est obtenue à partir d'une machine à eau ultrapure (la résistivité de cette eau vaut 18.2 mΩ.cm). Dans ce tampon, les apolipoprotéines A-I et A-II sont au dessus de leur point isoélectrique¹ (pI) (pI = 5.60 pour l'Apo A-I et pI = 4.88 pour l'Apo A-II) (34). Ainsi, leur forme anionique est favorisée et les protéines sont donc chargées négativement.

Des mesures à l'interface liquide/air sur cuve de Langmuir ont déjà été réalisées sur les apolipoprotéines échangeables A-I, A-II, C-I, C-II et C-III avec ce tampon (26).

3.3.3 Fabrication des solutions lipidiques de DPPC, DOPC et DPPG

Les trois phospholipides DPPC, DOPC et DPPG proviennent de la société Avanti Polar Lipids (Alabama, U.S.A) sous l'état de poudre. Nous dissolvons ces poudres dans une solution de chloroforme et nous diluons ensuite cette solution plusieurs fois afin d'obtenir des concentrations de 0.5 mM. Les solutions finales sont stockées à -20°C. Nous réalisons avant chaque expérience une isotherme sur la solution de lipides qui va être utilisée, afin de vérifier que cette solution ne contienne pas d'impuretés.

¹ Le point isoélectrique correspond à la valeur du pH pour laquelle ni la forme cationique de la protéine, ni la forme anionique ne sont privilégiées. Lorsque le pH est plus élevé que le pI la forme anionique est privilégiée, lorsqu'il est plus faible, c'est la forme cationique qui est privilégiée.

IV. La Microscopie à Force Atomique

Le premier microscope à force atomique (Atomic Force Microscope - AFM) a été mis au point par Binnig, Quate et Gerber en 1986 (35). Son principe est basé sur le contrôle des interactions locales entre une pointe-sonde extrêmement fine et la surface de l'échantillon. La sonde se déplace latéralement au dessus de l'échantillon. Sous l'effet des forces d'interaction avec la surface, la pointe va se rapprocher ou s'éloigner de la surface et la détection de ses mouvements va permettre d'obtenir une information tridimensionnelle sur la surface de l'échantillon. Les forces détectées sont de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-12} N et la résolution sur la hauteur du relief est de l'ordre de l'angström (0.1 nm).

4.1 La microscopie à champ proche

Les principaux instruments utilisés en microscopie à champ proche sont : le microscope à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscope – STM), le microscope de champ proche optique (Scanning Near-Field Optical Microscope – SNOM) et le microscope AFM. Nous décrirons brièvement ces différentes techniques ci-dessous, puis nous exposerons les avantages et inconvénients de l'AFM qui est le mode de microscopie en champ proche que nous avons utilisé au cours de ce travail.

Le STM permet d'obtenir une image topographique de la surface d'un échantillon conducteur à la résolution atomique. Dans le cas d'un échantillon non conducteur, cas fréquent dans le domaine biologique, l'échantillon doit être recouvert par un film métallique mince. Le SNOM, lui, comporte un intérêt double : il permet de réaliser la topologie de la surface de l'échantillon, mais aussi d'identifier les constituants grâce à la détection de leur fluorescence. Des mesures de spectroscopies IR et Raman ainsi que de la diffusion des molécules sont également réalisables. Cependant cette technique est très difficile à mettre en œuvre.

L'AFM a connu un grand développement en biologie, lié à plusieurs facteurs. Les plus importants sont la possibilité de caractériser la surface des échantillons non conducteurs sans avoir à dénaturer leur surface (comme dans le cas du STM) et la possibilité d'imager les

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

échantillons en milieu liquide (meilleure adaptation au milieu liquide que le STM), ce qui permet de conserver la structure native des macromolécules biologiques étudiées. La reproductibilité des expériences est bien établie lorsque la préparation des échantillons et les conditions de caractérisation sont maîtrisées. Cependant l'AFM possède aussi des inconvénients, car la pointe applique une force sur la surface imagée, qui peut entraîner le déplacement des molécules de l'échantillon lorsque celles-ci sont faiblement liées au substrat (le mode oscillant décrit dans la suite de cette section offre une solution à ce problème), ou encore déformer celui-ci (notamment lorsque l'échantillon est hydraté), ce qui conduit à une mesure erronée de la forme des objets imagés (la cryogénie offre une solution à ce problème). La capacité de l'AFM à répondre aux interrogations des biologistes sur l'organisation des composants d'une membrane biologique (formation de structures de type canaux ou pores) a déjà été démontrée (36-40).

4.2 Instrumentation

4.2.1 Principe de fonctionnement du microscope AFM

L'appareil utilisé au cours de ce travail est un microscope AFM multimode PicoPlus de la société Molecular Imaging (voir figure 19). Sur ce montage, un laser est disposé horizontalement et un miroir permet de focaliser le faisceau laser sur l'extrémité d'un levier triangulaire. Une pointe est fixée sur l'extrémité de ce levier. Après réflexion sur le levier, le faisceau est capté par une photodiode à quatre cadrans. Le signal créé par la photodiode à quatre cadrans indique la zone où la photodiode intercepte le faisceau laser (désigne le cadran recevant le plus d'intensité lumineuse), elle permet ainsi d'avoir accès à l'inclinaison du faisceau réfléchi et donc à l'inclinaison du levier selon l'axe x et selon l'axe y. Or l'inclinaison du levier dépend des forces exercées sur la pointe, donc de la distance entre la surface et la pointe.

Le levier étant placé sur une céramique piézoélectrique, nous pourrions ajuster la distance pointe - surface en appliquant une différence de tension de part et d'autre de la céramique, ce qui produira une contraction de celle-ci. De la même façon, en appliquant des différences de tension sur la céramique selon l'axe x ou l'axe y, la céramique piézoélectrique se contractera et permettra à la pointe de balayer la surface de l'échantillon.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

Nous obtiendrons au final une image tridimensionnelle de la surface de l'échantillon, grâce à un système d'asservissement qui, durant le balayage de la surface, va réguler la force exercée sur la pointe tout en enregistrant la variation de longueur du cristal piézoélectrique.

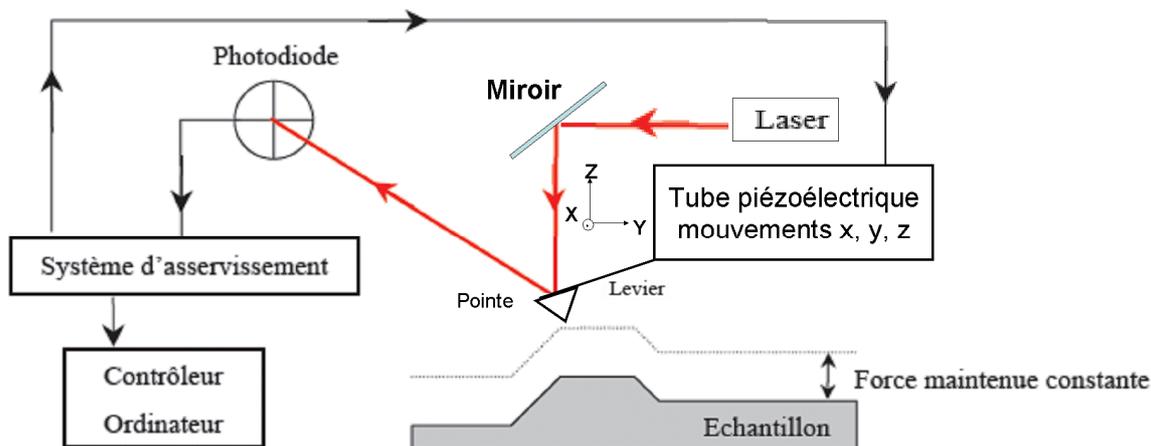


Figure 19 - Schéma de principe d'un microscope AFM.

4.2.2 Les éléments du montage

La pointe : il s'agit d'une pointe en nitrure de silicium fixée à l'extrémité d'un levier triangulaire (voir figure 20). Elle peut être décrite soit par un cône dont le demi angle ouvert est de 35° , soit par une sphère de rayon $r = 10 \text{ nm}$, soit par un atome de rayon $r = 0.3 \text{ nm}$.

Le levier : il a une forme triangulaire (voir figure 20). Son épaisseur et sa longueur (100 ou $200 \text{ }\mu\text{m}$) déterminent sa constante de raideur k ($0,06 - 0,38 - 0,58$ ou $0,12 \text{ N/m}$). Nous avons utilisé deux types de leviers, en fonction de la rigidité de l'échantillon imagé [$200\mu\text{m} - 0.06 \text{ N/m}$] ou [$100 \text{ }\mu\text{m} - 0.38 \text{ N/m}$]. La modification de la distance pointe - surface Δz provoquée par l'application d'une force F est ainsi reliée à cette constante de raideur k par la loi de Hooke :

$$F = k \cdot \Delta z \quad (\text{éq. 22})$$

Le levier est recouvert d'une fine couche d'or ($\sim 100 \text{ nm}$) pour permettre la réflexion du faisceau laser et ainsi la détection du mouvement du levier.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

Le système de détection optique : au repos, le faisceau est focalisé au centre de la photodiode à quatre cadrans (réglage par l'utilisateur). Lorsque le levier est courbé, l'impact du faisceau laser sur la photodiode se décale. L'intensité lumineuse captée par un cadran produit un photocourant, ainsi en mesurant les différences d'intensité entre les courants provenant des cadrans du haut et du bas de la photodiode, nous pouvons mesurer la déflexion du levier. De même, en mesurant les différences d'intensité entre les courants provenant des cadrans de la gauche et de la droite de la photodiode, nous pouvons mesurer l'angle de fléchissement latéral du levier produit par les forces de frictions.

Le système d'asservissement : le système d'asservissement modifie la position de la pointe, par la contraction du tube piézoélectrique, en fonction des informations détectées par la photodiode. Soit il réajuste la position de la pointe, afin de conserver la force d'interaction pointe - surface constante (la force de consigne est fixée par l'utilisateur), ce qui peut éventuellement lui permettre de réaliser ensuite un balayage avec une distance pointe - surface fixe, soit il réalise un balayage sans modifier la longueur selon z du tube piézoélectrique, ce qui correspond à un balayage à hauteur fixe et il réalise alors une cartographie de la force d'interaction pointe - surface.

La rapidité et l'ampleur de la réaction du système, suite à une modification du signal détecté par la photodiode, dépendent des paramètres P.I.D (Proportionnel, Intégré et Différentiel) du gain qui est associé à la boucle d'asservissement. Ces paramètres influencent la qualité de l'image, ainsi un gain trop faible va lisser l'image tandis qu'un gain trop élevé va créer des sur-oscillations à cause du temps de réponse du tube piézoélectrique ($\sim 1 \mu\text{s}$).

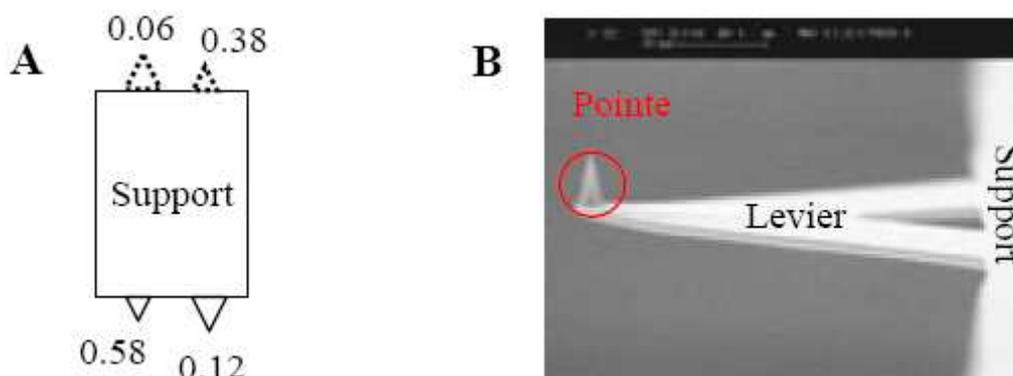


Figure 20 - Le support montré sur le schéma A ($\sim 3.5 * 1.5 \text{ mm}^2$) est doté de quatre leviers de constantes de raideur différentes. Nous voyons sur l'image B un des leviers avec sa pointe par microscopie électronique (Scientec).

4.3 Les modes de fonctionnement

4.3.1 Le mode contact

Le microscope AFM peut-être utilisé selon différents modes. **Au cours de ce travail, seul le mode contact a été utilisé**, nous allons détailler son principe ci-dessous. Le mode contact nécessite au préalable la réalisation d'une courbe de force. *La pointe est approchée puis éloignée de la surface* en restant toujours à X et à Y fixés (pas de balayage), ce qui permet de mesurer la déflexion du levier en fonction de la position de la pointe. Cette courbe de force peut-être décrite de la façon suivante (voir figure 21) :

Courbe d'approche :

- 1 - Dans un premier temps, la pointe s'approche de la surface sans subir d'interaction.
- 2 - A partir d'une certaine distance de l'échantillon, la pointe subit des interactions à longues distances attractives. *Le levier fléchit*, jusqu'à ce que la pointe soit en contact avec la surface. Ces forces attractives sont dues à des interactions d'origine électrostatique entre les charges présentes sur l'échantillon et celles présentes sur la pointe.
- 3 - La pointe est en contact avec l'échantillon. Au fur et à mesure qu'elle presse la surface, la force de réaction de l'échantillon devient plus importante et *le levier se redresse*. Lorsque la déflexion s'annule, les forces exercées sur la pointe s'annulent. Le levier continue ensuite de se redresser.

Courbe de retrait :

- 4 - La pointe appuie de moins en moins fort sur la surface, qui exerce sur elle une réaction également de moins en moins forte. *Le levier tend à s'incliner dans le sens opposé*. Les forces de capillarités créent sur la pointe un effet d'hystérésis et la courbe de retrait se distingue ainsi de la courbe d'approche.
- 5 - La pointe est toujours soumise aux interactions attractives de longues distances, mais elle n'est plus en contact avec la surface. *Le levier se redresse*.
- 6 - La pointe est libre.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

Cette opération permet d'établir une déflexion de consigne (donc une force de consigne), afin que la pointe reste en contact avec l'échantillon en n'appuyant que légèrement, pour suivre le contour de la surface. Lors de l'imagerie de l'échantillon, le système d'asservissement modifiera la longueur du cristal piézoélectrique de manière à ce que la déflexion reste égale à la consigne. La déflexion étant liée à la distance pointe - surface, nous obtenons bien au final une image représentant la topographie de l'échantillon. Cependant cette déflexion de consigne, puisqu'elle implique une force de consigne, doit être modifiée au cours de l'acquisition en fonction de la rigidité de la zone imagée de manière à ce que la pointe reste toujours à la même distance par rapport à l'échantillon (sans creuser la surface, ni sans se détacher de cette dernière).

Le mode contact permet également d'obtenir des images de la déflexion (signal provenant de l'inclinaison du levier suivant les forces verticales) et de la friction (signal provenant de l'inclinaison du levier suivant les forces latérales). La déflexion permet d'affiner le réglage des paramètres P.I.D du gain du système d'asservissement, tandis que la friction fournira une information sur les interactions latérales.

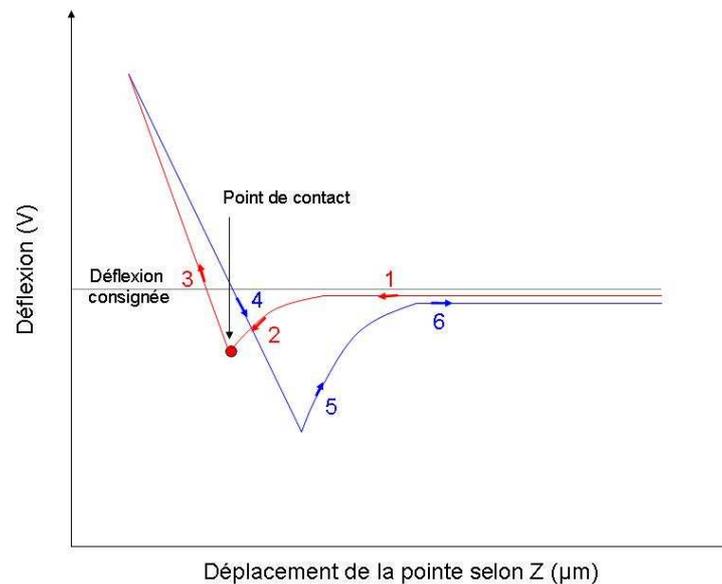


Figure 21 – Courbe de force en mode contact :
l'approche est en rouge et le retrait, en bleu .

4.3.2 Autres modes d'imagerie existant sur l'AFM

- *Le mode contact oscillant.* Il consiste à faire osciller la pointe au dessus de l'échantillon à sa fréquence de résonance, avec des amplitudes d'oscillation variant entre 1 et 200 nm. Lors de l'approche et du contact, le mouvement perd de l'énergie ce qui provoque une diminution de son amplitude. Le système modifie alors la hauteur de la pointe pour conserver l'amplitude de cette oscillation et détermine ainsi la topographie de la surface de l'échantillon. L'intérêt de ce mode est de réduire la friction et les déformations élastiques des échantillons.

- *Le mode non-contact.* Avec ce mode, la pointe oscille au dessus de la surface à une distance telle qu'elle n'établit aucun contact avec l'échantillon (l'amplitude est faible). Le paramètre important n'est plus dans ce cas la force, mais la dérivée de la force attractive en fonction de la distance pointe - surface. Ce mode est très peu utilisé en biologie.

4.4 Les images AFM

4.4.1 Les paramètres de visualisation

L'image AFM est affichée à l'écran sous la forme d'une image de 512 lignes sur 512 colonnes. Cette image est acquise à une fréquence d'environ 1 Hz (1 ligne par seconde) et ne montre que les lignes correspondant au balayage de la pointe de la gauche vers la droite de l'image. Le champ de vue doit être défini par l'utilisateur avant de lancer l'acquisition de l'image, il correspond à la surface de l'échantillon imagée ou bien encore à la surface délimitée par un pixel. L'image est acquise puis affichée à l'écran ligne après ligne. L'échelle des hauteurs est représentée par une variation de couleurs, allant du plus sombre au plus clair lorsque la hauteur augmente. Les hauteurs minimales et maximales de l'échelle sont fixées par l'utilisateur. Chaque pixel correspond à une mesure de la hauteur sur l'échantillon, une couleur lui est alors associée pour représenter la hauteur mesurée (voir figure 22).

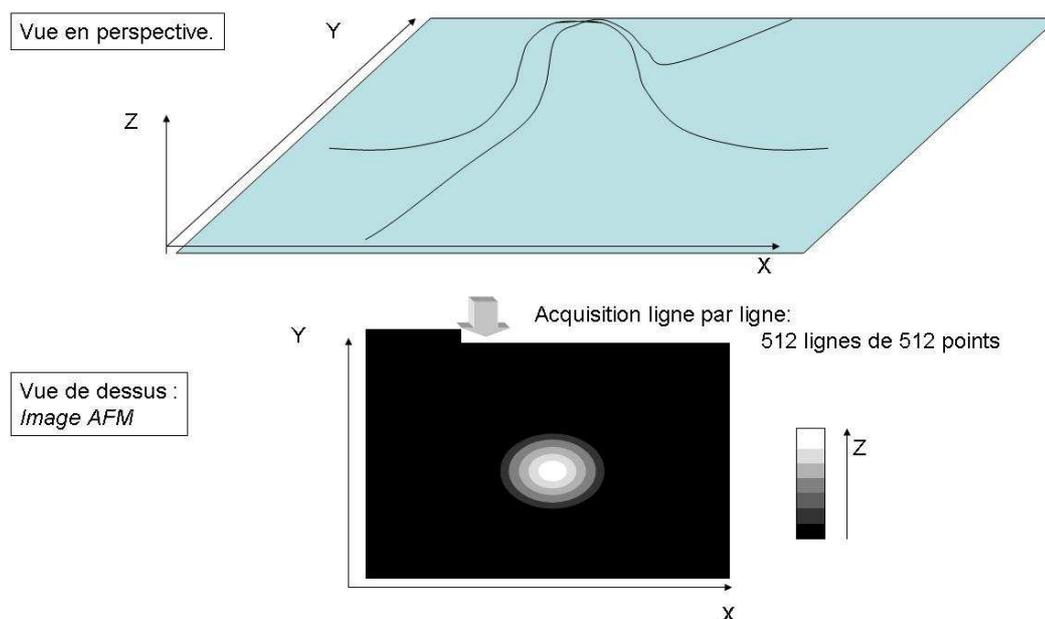


Figure 22 – Principe de la représentation d'une image en microscopie AFM. En haut, la surface est vue en perspective, en bas, la même surface est représentée sur une image AFM avec la hauteur codée en couleurs (ou en niveau de gris).

4.4.2 Les facteurs jouant sur la résolution de l'image

Plusieurs paramètres ont une incidence sur la résolution spatiale du microscope à force atomique, l'angle d'ouverture de la pointe, la constante de raideur du levier et l'ampleur du mouvement du cristal piézoélectrique. Cependant tous ces paramètres n'exercent pas une influence aussi limitante les uns que les autres.

La haute sensibilité de la résolution spatiale sur la distance pointe - surface en microscopie AFM vient de la forte décroissance spatiale des interactions à courte distance (en $1/r^{12}$). Or la pointe est un objet tridimensionnel, elle va lisser la décroissance spatiale de cette force en moyennant les interactions exercées à courte et à longue distance. La forme de la pointe est donc l'élément déterminant pour obtenir une bonne résolution et l'angle d'ouverture du cône doit être le plus petit possible (voir figure 23). L'angle du cône influe aussi sur la résolution latérale. La distance minimale d permettant de séparer deux pics (résolution latérale) est donnée par la formule suivante (41) (voir figure 23) :

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

$$d = \sqrt{2R}(\sqrt{\Delta z} + \sqrt{\Delta z + \Delta h}) \quad (\text{éq.23})$$

où R est le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe, Δh est la différence de hauteur entre les deux pics, d est la distance réelle entre ces deux pics et Δz est la différence de hauteur entre le pic le plus petit et le point de séparation entre les deux formes imagées.

La constante de raideur du levier joue elle aussi un rôle sur la résolution de la distance pointe - surface. D'après l'équation 22, pour une même valeur de la force F , plus la constante de raideur k est forte et plus la distance pointe - surface Δz est faible et donc plus l'inclinaison du levier est faible. En conséquence, la sensibilité sur la mesure de la force augmente lorsque la constante de raideur du levier diminue.

Par ailleurs, la précision des mouvements de la céramique piézoélectrique (fraction d'angström), n'est pas un facteur limitant et permet au microscope AFM d'atteindre une haute résolution.

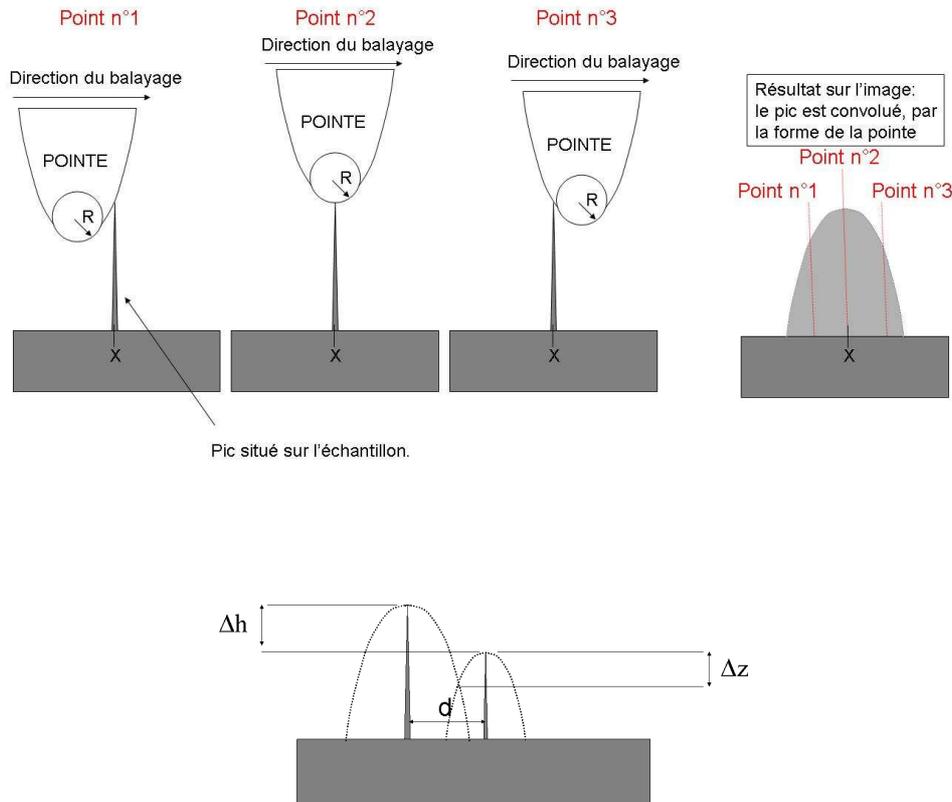


Figure 23 – Convolution d'un pic à la surface de l'échantillon par la pointe (en haut), et implication sur la résolution de l'image (en bas).

4.4.3 Les artéfacts

La microscopie AFM de part sa complexité peut être soumise à un ensemble d'artéfacts d'origines très diverses. Il est exposé ici les trois principales sources d'erreurs sur les images obtenues par AFM.

La première source d'erreur concerne l'altération de la pointe. Il peut apparaître à l'extrémité de celle-ci une deuxième protubérance provoquant un effet de double pointe. L'image qui apparaît alors à l'écran correspond à l'image normale convoluée par une fonction dépendant de la nouvelle forme de la pointe (voir figure 23). La forme des objets dépend de la modification produite par la protubérance, ainsi une forme récurrente va se retrouver sur cette image. Ces doubles pointes résultent soit d'une mauvaise fabrication, soit d'une contamination au cours du balayage. De plus, la déformation de la pointe peut produire une modification de sa rigidité et conduire à une détermination erronée de la forme des objets.

La deuxième source d'erreur concerne les interférences optiques sur la photodiode. En effet, le faisceau laser n'est pas toujours entièrement réfléchi par le levier, une partie est transmise à travers le levier et se réfléchit sur l'échantillon. Cette réflexion provoque des interférences optiques sur la photodiode, ce qui résulte en des oscillations sur l'image AFM.

La troisième source d'erreur concerne le traitement des données après leur acquisition. Sur l'image AFM, les données brutes nécessitent des corrections ligne par ligne afin de soustraire une ligne de base, produite par le mouvement non linéaire de la pointe lors du balayage (le mouvement de la pointe selon x ou y n'étant pas parfait, il affecte également sa position selon z). La soustraction de cette ligne de base peut produire des erreurs sur la topographie de la surface, notamment en présence de domaines larges dont la hauteur diffère de la hauteur moyenne sur l'image (voir figure 24). Ces erreurs peuvent en partie être corrigées après acquisition, en appliquant un traitement sur une zone précise de l'image.

D'autres artéfacts, peuvent être provoqués par différents paramètres comme un gain trop élevé, une vitesse de balayage trop grande, une mauvaise focalisation du faisceau laser sur le levier, ou encore la présence de vibrations mécaniques (le microscope est donc placé sur un dispositif anti-vibratoire).

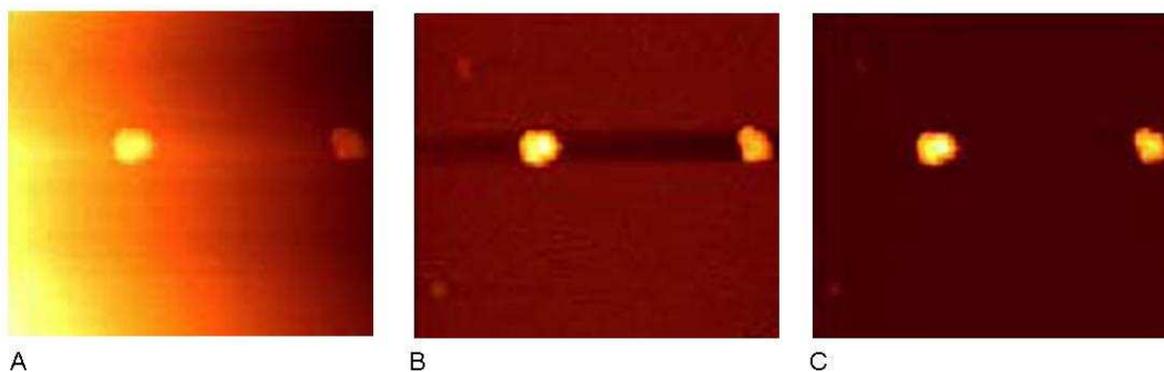


Figure 24 - Illustration d'un problème provoqué par le traitement post-acquisition des données (42). L'image A correspond à l'image brute sans correction, la non linéarité du mouvement de balayage induit des variations de hauteurs. L'image B représente l'image précédente corrigée ligne par ligne à l'aide d'une fonction polynomiale (l'ordre est paramétrable). Cette correction provoque une estimation erronée de la hauteur de la surface entre les deux objets de couleur claire. Cet effet est corrigé par un traitement local, le résultat final est montré sur l'image C.

4.5 Préparation des échantillons par la méthode de Langmuir-Blodgett

Pour étudier le film interfacial présent à la surface de la cuve avec le microscope AFM, nous devons déposer un échantillon de ce film sur un substrat solide. Ainsi, nous avons utilisé une méthode appelée méthode de Langmuir-Blodgett (en raison des noms de ces inventeurs), pour transférer une partie du film interfacial sur un support solide en utilisant les interactions entre la partie hydrophile de la couche et le support.

Dans notre protocole, une plaque de mica est placée verticalement sur un dispositif motorisé intégré à la cuve et paramétrable par le logiciel fourni avec cette cuve (Nima technology Ltd., Angleterre). Le moteur va ainsi descendre lentement la plaque de mica (la vitesse est d'environ 0.16 mm/min) pour la plonger en sous-phase jusqu'à une profondeur d'environ 1 cm, après avoir traversé le film interfacial. Lors de la remontée (effectuée avec la même vitesse que la descente), la plaque de mica hydrophile entraîne la couche avec elle. Les barrières motorisées contrôlent la pression du film, tout au long du prélèvement, de manière à ce qu'elle reste égale à sa valeur à l'équilibre thermodynamique (voir figure 25). L'intérêt

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

d'utiliser ici une plaque de mica est double, d'une part il est hydrophile, d'autre part ce matériau a une structure atomique en feuillets qui, après clivage, permet d'obtenir une surface sans impureté et atomiquement plane.

Cette méthode peut également être utilisée pour former des multicouches, à partir du film interfacial (par exemple sur des phospholipides), en faisant monter et redescendre la plaque un certain nombre de fois.

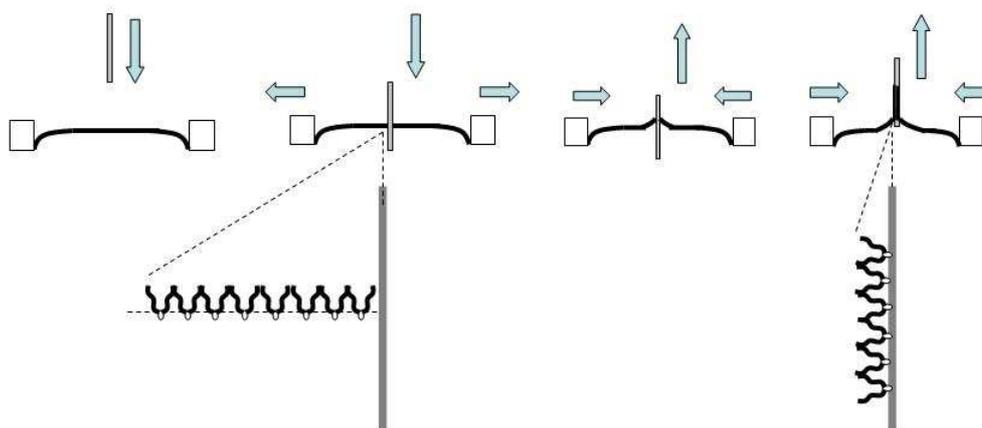


Figure 25 - Schéma de principe d'un prélèvement de Langmuir-Blodgett sur une monocouche de phospholipides. Les flèches bleues indiquent les mouvements des barrières et de la plaque de mica, le trait noir épais représente le film interfacial. Au fur et à mesure que la plaque prélève le film à la surface de la cuve, les barrières régulent la pression. En bas, les figures montrent la position des phospholipides à l'interface liquide/air puis sur la plaque de mica.

Bibliographie du chapitre 2

1. Langmuir, I. 1917. *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. liquids.1.* *Journal of the American Chemical Society* 39:1848-1906.
2. Blodgett, K. B. 1935. *Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface.* *Journal of the American Chemical Society* 57:1007-1022.
3. Blodgett, K. B., and I. Langmuir. 1937. *Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties.* *Physical Review* 51:964.
4. de Feijter J.A, Benjamins J, and Veer F.A. 1978. *Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface.* *Biopolymers Volume 17:1759-1772.*
5. Berge, B., and A. Renault 1993. *Ellipsometry Study of 2D Crystallization of 1-Alcohol Monolayers at the Water Surface.* *EPL* 21:773-777.
6. Azzam, R. M. A., and N. M. Bashara. 1977. *Ellipsometry and Polarized Light. N-H PL, Editor:340.*
7. Greenler, R. G. 1966. *Infrared Study of Adsorbed Molecules on Metal Surfaces by Reflection Techniques.* *J. Chem. Phys.* 44:310-315.
8. Greenler, R. G. 1969. *Reflection Method for Obtaining the Infrared Spectrum of a Thin Layer on a Metal Surface.* *The Journal of Chemical Physics* 50:1963-1968.
9. Saccani, J. 2003. *Réalisation de systèmes membranaires modèles et étude de leur organisation par microscopie à l'angle de Brewster, spectroscopie PM-IRRAS et dichroïsme circulaire vibrationnel. .* *Thèse de doctorat de l'Université Bodeaux I. .*
10. Blaudez, D., J.-M. Turllet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. 1996. *INVESTIGATIONS AT THE AIR/WATER INTERFACE USING POLARIZATION MODULATION IR SPECTROSCOPY J.* *Chem. Soc., Faraday Trans.* 92:525-530.
11. Arrondo, J. L., A. Muga, J. Castresana, and F. M. Goñi. 1993. *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy.* *Prog Biophys Mol Biol.* 59:23-56.
12. Byler, M. D., and H. Susi. 1986. *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra.* *Biopolymers* 25:469-487.
13. Dousseau, F., and M. Pezolet. 1990. *Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods.* *Biochemistry* 29:8771-8779.
14. Williams, R. W. 1986. *Protein secondary structure analysis using Raman amide I and amide III spectra.* *Methods Enzymol.* 130:311-331.
15. Castano, S. 1998. *Etude physico-chimique de peptides amphipathiques en interaction avec des membranes biologiques et modèles. Une approche par spectroscopies de fluorescence, PM-IRRAS et par dynamique moléculaire. .* *Thèse de doctorat de l'Université Bodeaux I.*
16. Miyazawa, T. 1967. *Infrared Spectra and Helical Conformations.* Marcel Dekker, New York.
17. Bandekar, J. 1992. *Amide modes and protein conformation.* *Bioch. Biophys. Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1120:123-143.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

18. Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, and J. M. Ruyschaert. 1994. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell Biochem.* 23:405-450.
19. Cornut, I., B. Desbat, J. M. Turllet, and J. Dufourcq. 1996. In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface. *Biophys J.* 70:305-312.
20. Tsuboi, M., Y. Mitsui, A. Wada, T. Miyazawa, and N. Nagashima. 1963. Infrared spectra and molecular conformations of D,L-copoly-gamma-benzylglutamates. *Biopolymers* 1:297-317.
21. Ishida, K. P., and P. R. Griffiths. 1993. Comparison of the amide I/II intensity ratio of solution and solid-state proteins sampled by transmission, attenuated total reflectance, and diffuse reflectance spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 47:584-589.
22. Castano, S., B. Desbat, M. Laguerre, and J. Dufourcq. 1999. Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj(i=2j) peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1416:176-194.
23. Blaudez, D., T. Buffeteau, J.-C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, and J. M. Turllet. 1993. Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. *Appl. Spectrosc.* 47:863-1086
24. Castano, S., B. Desbat, and J. Dufourcq. 2000. Ideally amphipathic [beta]-sheeted peptides at interfaces: structure, orientation, affinities for lipids and hemolytic activity of (KL)mK peptides. *Bioch. Biophys. Acta* 1463:65-80.
25. Bottier, C., J. Géan, B. Desbat, A. Renault, D. Marion, and V. Vié. 2008. Structure and Orientation of Puroindolines into Wheat Galactolipid Monolayers. *Langmuir* 24:10901-10909.
26. Bolanos-Garcia, V. M., A. Renault, and S. Beaufils. 2008. Surface Rheology and Adsorption Kinetics Reveal the Relative Amphiphilicity, Interfacial Activity, and Stability of Human Exchangeable Apolipoproteins. *Biophys J.* 94:1735-1745.
27. Bolaños-García V.M., Ramos S., Castillo R., Xicohtencatl-Cortes J., and M.-O. J. 2001. Monolayers of Apolipoproteins at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem. B* 105 (24):5757 -5765.
28. Davies, J. T., and E. K. Rideal. 1963. *Interfacial Phenomena. Second Edition.* Academic Press. New-York and London, Chapter 1.
29. Dervichian D.G. 1939. Changes of Phase and Transformations of Higher Order in Monolayers. *Journal of Chemical Physics* 7:931-948.
30. Gaines, G. L. J. 1966. In *Insoluble Monolayers at Liquid-gas Interfaces.* Prigorine, I., Ed. Interscience. New York, Chapter 6. .
31. Bottier C. 2006. Caractérisation des puroindolines, des galactolipides du blé et de leurs interactions : Mesures physiques aux interfaces. Université de Rennes 1.
32. Le Rumeur, E., Y. Fichou, S. Pottier, F. Gaboriau, C. Rondeau-Mouro, M. Vincent, J. Gallay, and A. Bondon. 2003. Interaction of Dystrophin Rod Domain with Membrane Phospholipids. EVIDENCE OF A CLOSE PROXIMITY BETWEEN TRYPTOPHAN RESIDUES AND LIPIDS. *J. Biol. Chem.* 278:5993-6001.
33. Legardinier, S., J.-F. Hubert, O. L. Bihan, C. Tascon, C. Rocher, C. Raguénès-Nicol, A. Bondon, S. Hardy, and E. L. Rumeur. 2008. Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1784:672-682.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

34. Utermann G., Feussner G., Franceschini G., Haas J., and S. A. 1982. Genetic Variants of Group A Apolipoproteins Rapid Methods for Screening and Characterization Without Ultracentrifugation. *JBC* 257:501-507.
35. Binnig, G., C. F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56:930.
36. Vié V. 1999. *Etude des microdomaines membranaires par microscopie de champ proche. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II.*
37. Müller, D. J., C.-A. Schoenenberger, F. Schabert, and A. Engel. 1997. Structural Changes in Native Membrane Proteins Monitored at Subnanometer Resolution with the Atomic Force Microscope: A Review. *Journal of Structural Biology* 119:149-157.
38. Scheuring S., Fotiadis D., Möller C., Müller S.A., Engel A., and Müller D.J. 2001. Single Proteins Observed by Atomic Force Microscopy. *Single Molecules* 2:59-67.
39. Fotiadis, D., S. Scheuring, S. A. Müller, A. Engel, and D. J. Müller. 2002. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron* 33:385-397.
40. Muller, D. J. 2008. AFM: A Nanotool in Membrane Biology *Biochemistry* 47:7986-7998.
41. Bustamante, C., and D. Keller. 1995. Scanning Force Microscopy in Biology. *Physics Today* 48:32-38.
42. West, P., and N. Starostina. AFM Image Artifacts. Lot-Oriel Gruppe Europa

Chapitre 2 – Matériels et méthodes – Mesures aux interfaces.

CHAPITRE 3

Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction

Apo A-I/phospholipides

I. Mesures tensiométriques et ellipsométriques

L'utilisation en parallèle de l'ellipsométrie et de la mesure de la pression de surface permet de mettre en évidence le mode d'interaction de la protéine avec la couche de phospholipides (interaction en sous-phase ou insertion dans la couche). Ces deux techniques permettent également d'établir un classement des lipides en fonction de leur affinité avec la protéine. Nous tentons d'observer ici des différences d'affinité produites par les différences dans la charge et dans la phase des phospholipides.

1.1 L'Apo A-I s'insère dans les monocouches de DPPC, DOPC et DPPG

Un volume de solution lipidique, de l'ordre d'une vingtaine de microlitres, est déposé à l'aide d'une seringue Hamilton à la surface de la cuve de Langmuir avec les barrières ouvertes. Ainsi la pression de la couche de lipides est initialement nulle. Après un délai nécessaire à l'évaporation du chloroforme (10 min.), cette couche lipidique est comprimée lentement à l'aide des barrières en téflon avec une vitesse de 20 cm²/min, jusqu'à atteindre la pression de surface voulue avant l'injection de la protéine. Les barrières sont alors immobilisées, la pression dans la couche est ainsi libre d'évoluer et la protéine est injectée

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

avec une seringue sous la couche de lipides, en faisant passer l'aiguille sous l'une des barrières en téflon (la couche de lipides n'est donc pas traversée par l'aiguille).

Nous enregistrons l'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique au cours de la cinétique d'adsorption de l'Apo A-I à l'interface liquide/lipides. Nous considérons que le système est arrivé à l'état d'équilibre lorsque ces deux grandeurs atteignent une valeur stable dans le temps. L'expérience est d'abord réalisée sous une couche de DPPG, avec une pression avant injection de 20 mN/m. L'augmentation de la pression de surface créée par l'Apo A-I est de 5 mN/m et montre que la protéine s'adsorbe à l'interface liquide/lipides. L'augmentation de l'angle ellipsométrique est de 2.5°, ce qui est faible par rapport à l'augmentation de 7° créée par l'adsorption de cette protéine à l'interface liquide/air, alors que la concentration de protéines en sous-phase est identique (voir figure 1). Ainsi, la quantité de résidus situés en sous-phase est très faible comparativement à la quantité de résidus que contiendrait une couche continue située sous la couche de phospholipides. La surpression observée est donc trop forte pour être provoquée par une faible quantité de résidus interagissant avec la couche en sous-phase. Nous en concluons que l'Apo A-I, ou une partie de ces résidus, s'insère dans la couche de phospholipides, entre les têtes polaires (1, 2). Ces expériences sont réalisées pour les trois phospholipides, avec des pressions avant injection de la protéine variant entre 8 mN/m et 30 mN/m. Dans tous les cas, on constate que lorsque l'Apo A-I est présente à l'interface liquide/lipides, elle est insérée dans la couche de phospholipides.

1.2. Différences d'affinité de l'Apo A-I pour DPPC, DOPC et DPPG

Nous avons étudié l'adsorption de l'Apo A-I pour différentes valeurs de la pression de la couche de lipides avant l'injection de la protéine. Les variations de l'angle ellipsométrique et de la pression de surface provoquées par l'insertion de la protéine furent mesurées à la fin de la cinétique et sont reportées sur la figure 2 pour DPPC, DOPC et DPPG. Nous constatons que plus la pression du lipide avant injection est forte et plus les augmentations de la pression et de l'angle ellipsométrique induites par l'adsorption de la protéine sont faibles, pour les trois lipides. Ceci confirme l'insertion de la protéine dans la couche de lipides, quelque soit la pression initiale de cette couche. Nous constatons aussi que l'augmentation de la pression est

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

plus forte pour DPPG que pour les phospholipides zwitterioniques quelque soit la pression initiale, ce qui montre une insertion et une interaction plus fortes de l'Apo A-I avec le lipide chargé négativement. La variation de l'angle ellipsométrique est également plus élevée dans le cas de DPPG que pour les deux autres lipides. Cependant, nous ne savons pas si cette différence est liée à la plus grande quantité de protéines insérées dans la couche ou si elle indique un changement dans l'organisation de la protéine dans la couche de lipides.

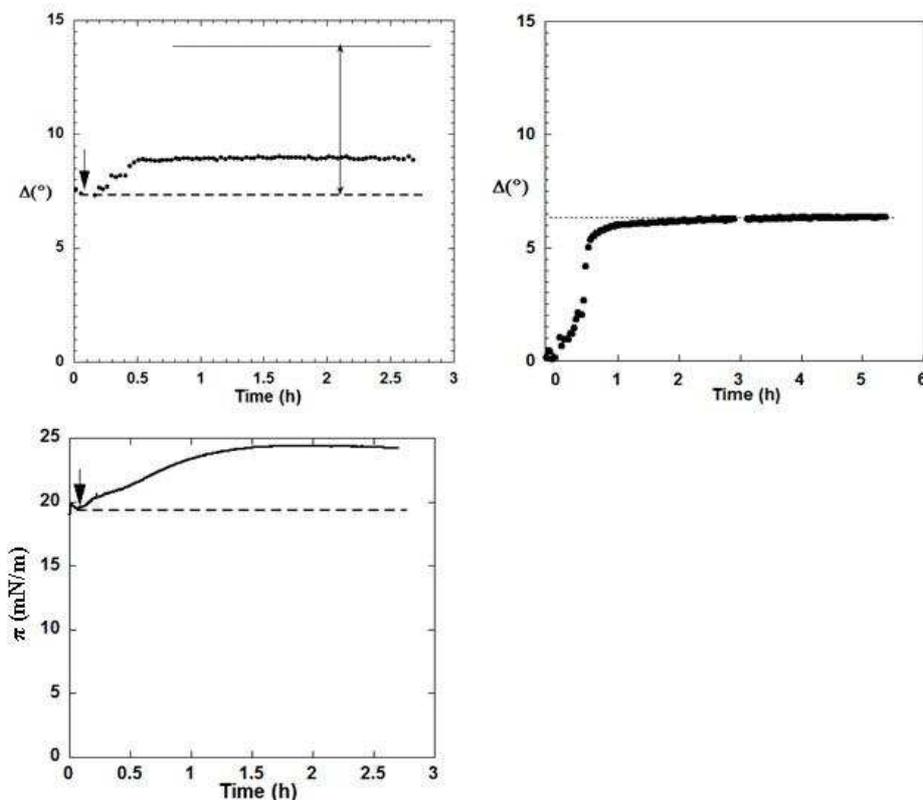


Figure 1 – Graphe de la valeur de l'angle ellipsométrique en fonction du temps lors de l'adsorption de l'Apo A-I à l'interface liquide/air (à droite). Graphes de la valeur de l'angle ellipsométrique (en haut, à gauche) et de la pression de surface (en bas, à gauche) en fonction du temps lors de l'adsorption de l'Apo A-I à l'interface liquide/DPPG, pour une pression avant injection de 20 mN/m. Les valeurs à l'équilibre montrent l'insertion de la protéine dans la couche de lipides.

Une manière de caractériser la différence d'affinité de l'Apo A-I pour chacun de ces trois lipides est de mesurer leur pression d'exclusion π_e . π_e est la valeur de la pression avant injection à partir de laquelle la protéine ne provoque plus aucun changement dans la pression de surface. En réalisant une régression linéaire sur les groupes de points présentés sur la

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

figure 2, nous obtenons les valeurs suivantes : pour **DPPG**, $\pi_e = 39$ mN/m, pour **DOPC**, $\pi_e = 31$ mN/m et pour **DPPC**, $\pi_e = 27$ mN/m. Ces mesures montrent une interaction plus forte de l'Apo A-I avec DPPG, qu'avec DPPC et DOPC. Elles montrent également, mais de façon plus modérée, une interaction plus forte avec DOPC qu'avec DPPC. La mesure de la pression d'exclusion π_e^* , qui correspond à la pression de la couche avant injection à partir de laquelle la protéine ne fait plus varier l'angle ellipsométrique, donne le même classement pour les lipides, mais reste moins fiable à cause de la dispersité des valeurs.

Les données ellipsométriques et tensiométriques mettent en évidence une insertion et une interaction plus fortes de l'Apo A-I avec le lipide chargé négativement qu'avec les lipides zwitterioniques. Elles montrent également, mais dans une moindre mesure que pour les lipides zwitterioniques, l'interaction peut se produire jusqu'à une pression avant injection plus forte si le lipide est en phase LE (DOPC) que si le lipide passe en phase LC (DPPC) (voir section 3.2.1).

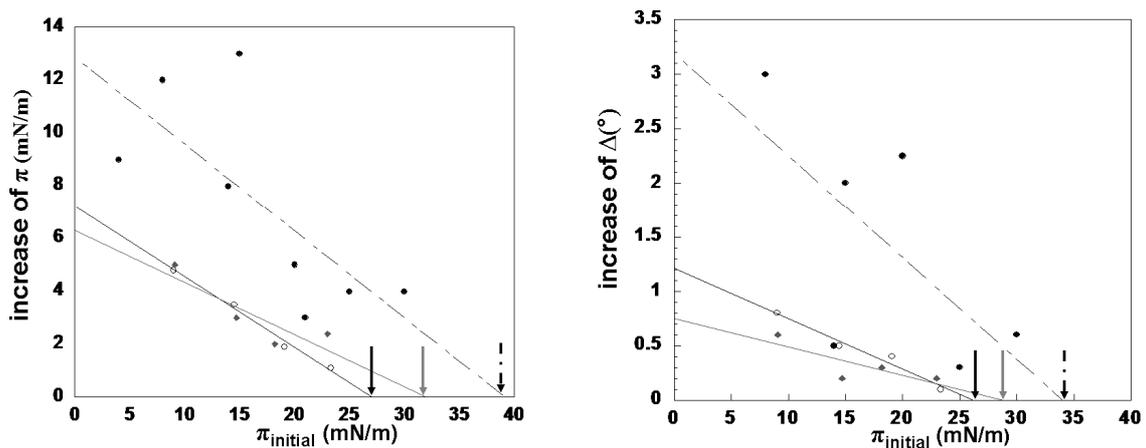


Figure 2 – Graphes de la variation de la pression de surface (à gauche) et de la variation de l'angle ellipsométrique (à droite) provoquée par l'Apo A-I en fonction de la pression du lipide avant l'injection de la protéine, pour DPPC (ronds creux), DOPC (losanges gris) et DPPG (ronds pleins). Les flèches indiquent les pressions d'exclusion π_e et π_e^* pour DPPC (flèche noire), DOPC (flèche grise) et DPPG (flèche noire en pointillés).

II. Etude par AFM des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/phospholipides

Les études par ellipsométrie et tensiométrie ont mis en évidence l'insertion de la protéine dans les monocouches de phospholipides, pour les lipides étudiés. Elles ont également montré des différences dans l'affinité de la protéine pour chacun d'eux. Grâce à l'utilisation de la microscopie à force atomique, nous avons constaté que la protéine s'insère en créant des objets de taille nanométrique dans la couche de lipides. Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la charge et de la phase du lipide sur les caractéristiques géométriques des particules créées par les protéines. Nous avons ensuite mesuré, pour chaque lipide, la surface totale occupée par ces particules sur plusieurs images AFM et nous l'avons comparée aux différences d'affinités caractérisées par ellipsométrie et tensiométrie.

2.1. Méthode pour analyser la forme des particules créées par la protéine dans la couche de lipides

Dans nos expériences, les protéines ne sont pas entièrement insérées dans la couche lipidique. Elles forment ainsi des objets de hauteur et de largeur variables (voir figure 3), qui sont visibles sur nos images AFM. Cependant, il est assez difficile d'estimer par un examen à l'œil des images, les tailles majoritaires de ces objets et la variation de la distribution des tailles lorsque l'on modifie certaines conditions, comme par exemple la phase ou la charge du lipide utilisé. Toujours avec un examen à l'œil des images, nous pouvons constater que la surface totale occupée par ces objets dans la couche varie lorsque les conditions précédentes varient. Mais comme la microscopie AFM ne donne accès qu'à une fraction très réduite de la surface de l'échantillon prélevé sur le film interfacial, nous devons donc réaliser plusieurs images de cet échantillon et estimer la valeur moyenne et la variabilité de la surface d'occupation pour analyser de façon quantitative ces différences.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

Trois paramètres nous ont paru intéressants pour caractériser la taille des particules protéiques : leur hauteur, leur surface et leur périmètre. Ces paramètres sont mesurés sur plusieurs images, provenant soit du même échantillon, soit de plusieurs échantillons réalisés dans les mêmes conditions, ce qui permet de tenir compte de la variabilité des mesures. Nous présentons ces valeurs dans des histogrammes à une dimension, comptabilisant pour chaque valeur d'un des trois paramètres, soit le nombre moyen de particules par image, soit la fraction de particules (le nombre de particules pour une valeur divisé par le nombre total de particules). Le deuxième type d'histogramme (normalisé par le nombre total de particules) peut être vu comme une mesure de la probabilité, pour ces particules, d'opter pour telle ou telle hauteur, surface ou périmètre. Nous pouvons également regarder l'information sous la forme d'un graphe qui pour chaque particule affiche la valeur d'un paramètre en fonction d'un autre (exemple : le graphe de la surface en fonction du périmètre). La surface totale occupée par ces objets dans la couche étudiée est obtenue en sommant les surfaces occupées par toutes les particules et en divisant cette somme par le nombre d'images.

Pour réaliser ces mesures sur nos images AFM, nous avons utilisé le logiciel ImageJ. Il s'agit d'un logiciel de traitements d'images en libre accès (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La surface et le périmètre des objets présents sur l'image sont des paramètres fournis directement par ce logiciel, mais nécessitent auparavant d'avoir défini un seuil sur les images en niveaux de gris (NDG). Les pixels dont le NDG est supérieur ou égal à ce seuil se verront attribuer la valeur 255 (blanc), et ceux dont le NDG est inférieur à ce seuil se verront attribuer la valeur 0 (noir), créant ainsi une image binarisée. Image J pourra alors extraire la surface et le périmètre des formes sur l'image qui sont créées par les pixels de valeur 255. Ces formes sont en fait équivalentes à une section des objets réalisée à hauteur constante (voir figure 3). La valeur du seuil doit être suffisamment haute pour ne pas prendre en compte le lipide, mais suffisamment basse pour prendre en compte les particules de faibles hauteurs formées par la protéine. Certains artefacts comme ceux produits par les interférences optiques ou par le traitement post-acquisition vont modifier la hauteur du lipide et nous imposer d'augmenter le seuil (voir chapitre 1 section 3.4.3).

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

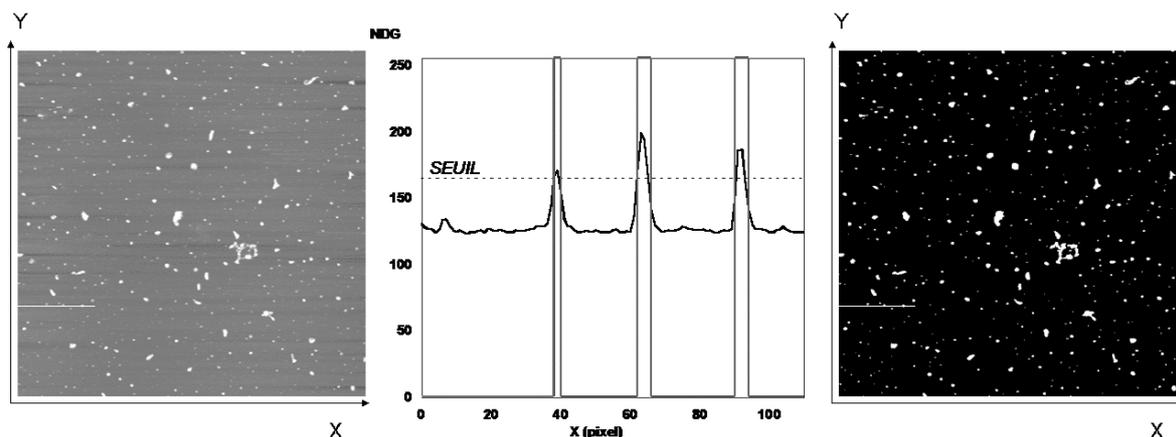


Figure 3 – Principe du seuillage d'une image AFM. A gauche, l'image est en niveaux de gris (NDG) et à droite elle est seuillée. Au centre, le graphe représente la valeur des pixels sur la ligne blanche pour les deux images. Si le NDG d'un pixel est supérieur à SEUIL, il prend la valeur 255 (blanc) sur l'image seuillée, sinon il prend la valeur 0 (noir).

ImageJ ne permet pas d'avoir accès directement à la hauteur des objets étudiés. Pour avoir accès à ce paramètre, j'ai du créer un programme exécutable avec ImageJ que j'ai écrit dans le langage défini pour ce logiciel (voir annexes 2 et 3). Le principe de ce programme consiste à rechercher la valeur maximale des pixels, sur l'image en NDG, dans un carré qui a le même centre et la même aire que l'objet observé (le sommet n'étant pas obligatoirement au centre de cet objet). Cette valeur maximale est alors attribuée à la hauteur. Nous pouvons également mesurer d'autres paramètres comme le ratio de la hauteur des objets sur leur rayon.

Les mesures sont effectuées sur les prélèvements où la protéine est insérée dans des couches de DPPC, DOPC et DPPG. Cependant, dans le cas de DPPC et de DPPG, la hauteur du lipide est hétérogène, l'épaisseur de la couche n'étant pas la même si le lipide est en phase Liquide Expansé (LE) ou en phase Liquide Condensé (LC) (voir chapitre 2 section 3.2.1). Cette différence de hauteur entre les phases a une influence sur les hauteurs des particules formées par la protéine et nous devons donc compter les particules dans chacune des phases en utilisant un seuil différent (voir figure 4). Ceci permettra par la suite de chiffrer la quantité de particules présentes dans chacune des phases.

Dans le cas de DPPG, la transition de phase du premier ordre $LE \rightarrow LC$ est obtenue pour une pression plus élevée que DPPC (dû à la charge globalement négative portée par les têtes polaires) et les domaines en phase LE représenteront une plus grande proportion de l'image que ceux présentés sur la figure 4. Certaines zones de l'image ne contiendront que de

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

la phase LE. Or, la correction de la hauteur effectuée par le microscope après l'acquisition de l'image (voir chapitre 2 section 3.4.3) conduira à placer ces zones à la même hauteur que la phase LC, ainsi la phase LE n'aura pas la même hauteur sur toutes les zones de l'image. Cet artéfact crée un problème pour estimer la quantité de particules présentes dans chacune des phases et impose d'utiliser un seuillage relatif à chaque image pour sélectionner l'ensemble des particules.

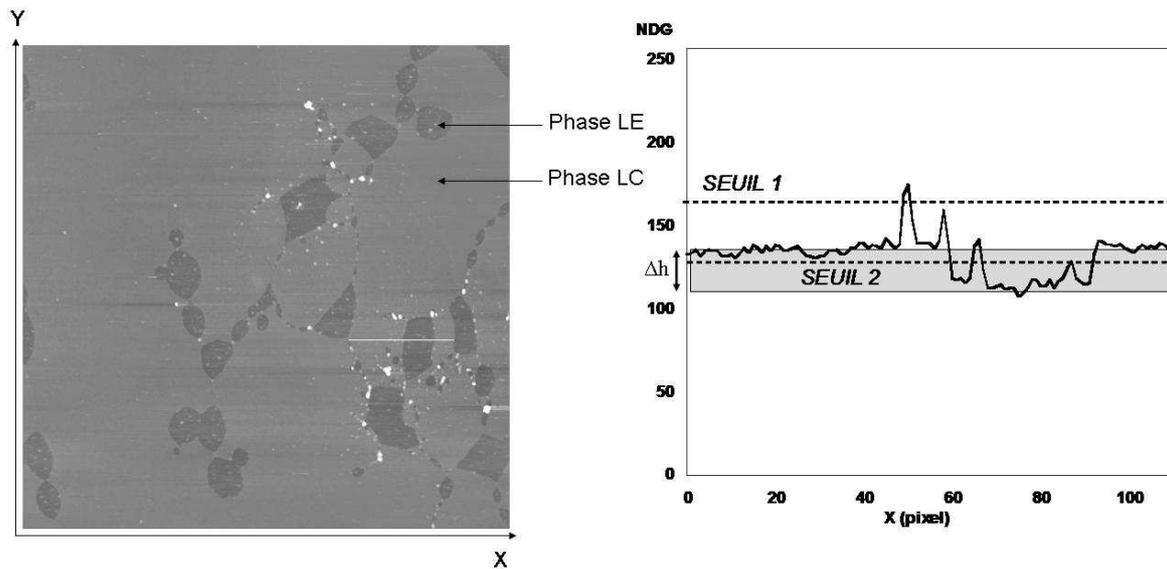


Figure 4 - Principe du seuillage d'une image AFM avec coexistence des phases LE (gris sombre) et LC (gris clair). A gauche, une image en NDG de DPPC où la protéine est insérée (objets blancs), à droite, un graphe représentant la valeur des pixels sur la ligne blanche. La zone grisée montre la différence de hauteur Δh entre phase LE et phase LC. Elle a une valeur comparable à la hauteur des objets créés par la protéine. Ceci impose d'utiliser deux seuils différents pour compter les objets dans chaque phase.

2.2 Etude de la forme des particules protéiques sur les couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG

Nous présentons sur la figure 5 des images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG, pour une pression initiale qui est de 15 mN/m (voir également annexe 4). Pour DPPC et DPPG les zones sombres correspondent à la phase LE et les zones claires à la phase LC. Pour DOPC, le fond uniforme correspond à la phase LE, qui est l'unique phase de ce lipide. Les objets blancs présents sur ces images sont créés par les protéines. Nous constatons que leur répartition n'est pas la même d'un lipide à l'autre et nous étudierons dans la suite de ce chapitre les différences d'occupation qui sont engendrées par les changements de phase et de charge des lipides. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la hauteur, la surface et le périmètre de ces particules protéiques sur les couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG. Cette pression initiale est l'une des plus faibles qui ait été utilisée au cours de ce travail, et comme nous l'avons montré précédemment, elle permet une insertion plus forte de la protéine dans la couche de lipides.

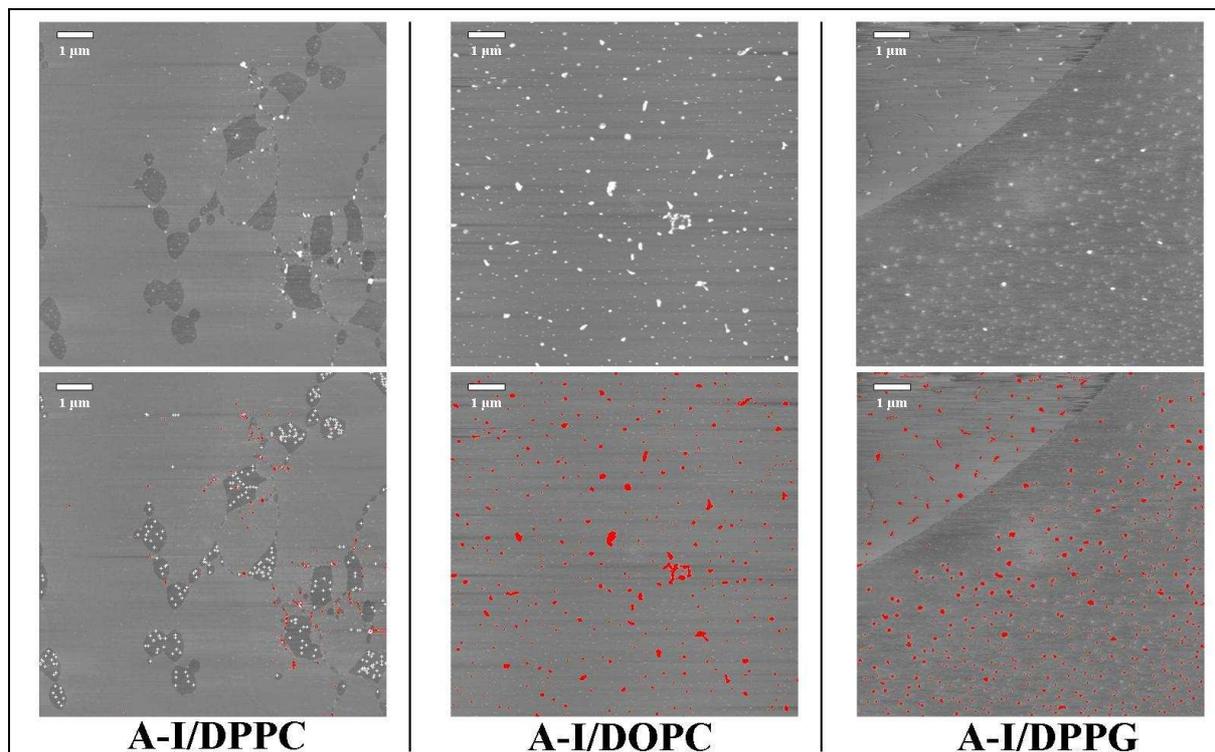


Figure 5 – Images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG, pour une **pression avant injection de 15 mN/m** (les hauteurs varient entre -5 et +5 nm). En bas, sur les mêmes images, **les objets dont la hauteur est supérieure à 1.4 nm sont marqués en rouge**. Dans le cas du DPPC, les objets présents dans la phase LE ont été marqués en blanc, leurs hauteurs sont inférieures à 1.4 nm.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

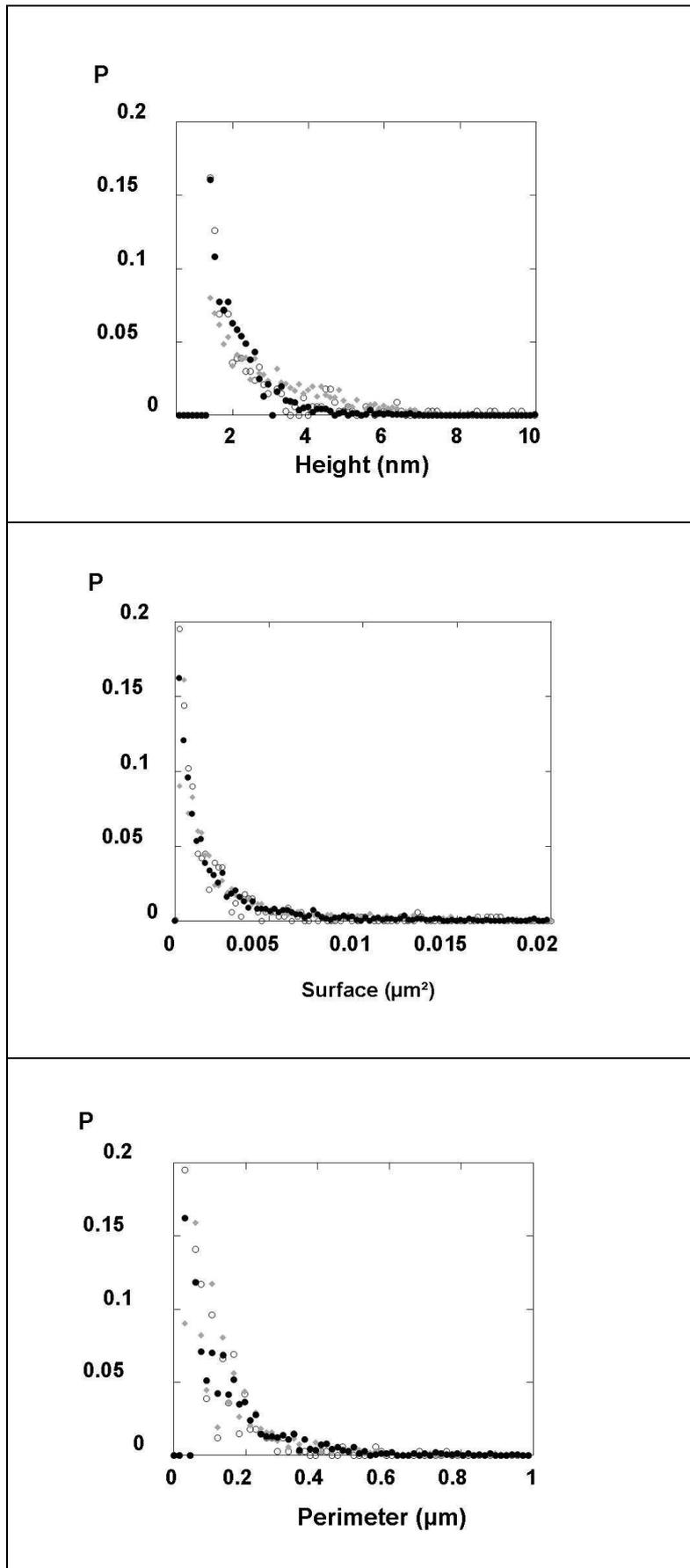


Figure 6 - Histogrammes normalisés de la hauteur, de la surface et du périmètre des objets pour : Apo A-I/DPPC (\circ), Apo A-I/DOPC (\diamond) et Apo A-I/DPPG(\bullet), pour une pression initiale de 15 mN/m. Utilisation d'un seuil unique NDG = 140 (1.4 nm).

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

La hauteur sur les images AFM est codée sur 256 niveaux de gris pour un intervalle allant de -15 nm à +15 nm (la plage de variation des hauteurs est plus grande que sur les images montrées dans la figure 5). Nous avons binarisé les images de manière à ne sélectionner que les pixels dont le NDG est supérieur ou égal à 140, ce qui correspond à une hauteur de 1.4 nm au dessus du lipide. Comme il a été expliqué précédemment, la différence de hauteur moyenne entre les régions où le lipide est en phase LE et celles où il est en phase LC est d'environ 1 nm. Dans le cas du DPPC, en se plaçant à une hauteur de 1.4 nm au dessus des domaines LC, nous ne sélectionnons que très peu de particules protéiques insérées dans les domaines LE (voir figure 5, les particules sélectionnées en rouge). Ceci nous permet d'obtenir des mesures de la forme des objets qui sont uniquement formés dans la phase LC. Par contre, dans le cas de DPPG, les domaines LE couvrent une grande partie de l'image et sont parfois difficiles à distinguer de l'autre phase. Ainsi, pour DPPG, les mesures tiennent compte des particules dans les deux phases (voir section 2.1).

Les mesures ont été effectuées pour Apo A-I/DPPC sur 328 particules, pour Apo A-I/DOPC sur 2065 particules et pour Apo A-I/DPPG sur 1351 particules. Pour les trois mélanges, on utilise au moins 6 images, correspondant chacune à une zone différente de l'échantillon. Les histogrammes obtenus sont affichés sur la figure 6. Aucune différence significative n'est visible sur la surface et sur le périmètre des objets entre les trois mélanges. Les distributions des hauteurs de ces objets sont également très proches, dans les trois cas, les variations d'un lipide à l'autre sont inférieures à 10%. Nous en concluons que, ni la phase, ni la charge des lipides étudiés n'ont de fortes influences sur la forme des particules protéiques lorsque nous les observons avec la résolution de nos images AFM (1 pixel ~ 250 nm²).

Cependant, nous constatons que la distribution des objets s'étend vers de plus grandes hauteurs dans DOPC que dans DPPC et DPPG. Or, l'épaisseur de la couche de DOPC possède une différence d'environ 1 nm, par rapport à celles de DPPC et de DPPG, qui elles sont identiques. Pour savoir, si la différence dans la distribution des hauteurs est imputable au changement d'épaisseur des couches de lipides purs, nous avons étudié la forme des objets dans DOPC en seuillant 1 nm plus haut, puis nous avons retranché 1 nm à la hauteur de ces objets afin de retrouver la même indexation des hauteurs que dans la phase LC de DPPC. Ainsi, l'ancien seuil correspondait à une hauteur de 1.4 nm (avec le NDG 140) et le nouveau seuil correspond à une hauteur de 2.4 nm (avec le NDG 149), par rapport à l'extrémité des chaînes du lipide (figure 4). Le nouvel histogramme concernant les hauteurs des objets dans DOPC avec ce nouveau seuil est présenté sur la figure 7. Ainsi, il semble qu'une différence persiste malgré la compensation du changement d'épaisseur entre les couches de lipides.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

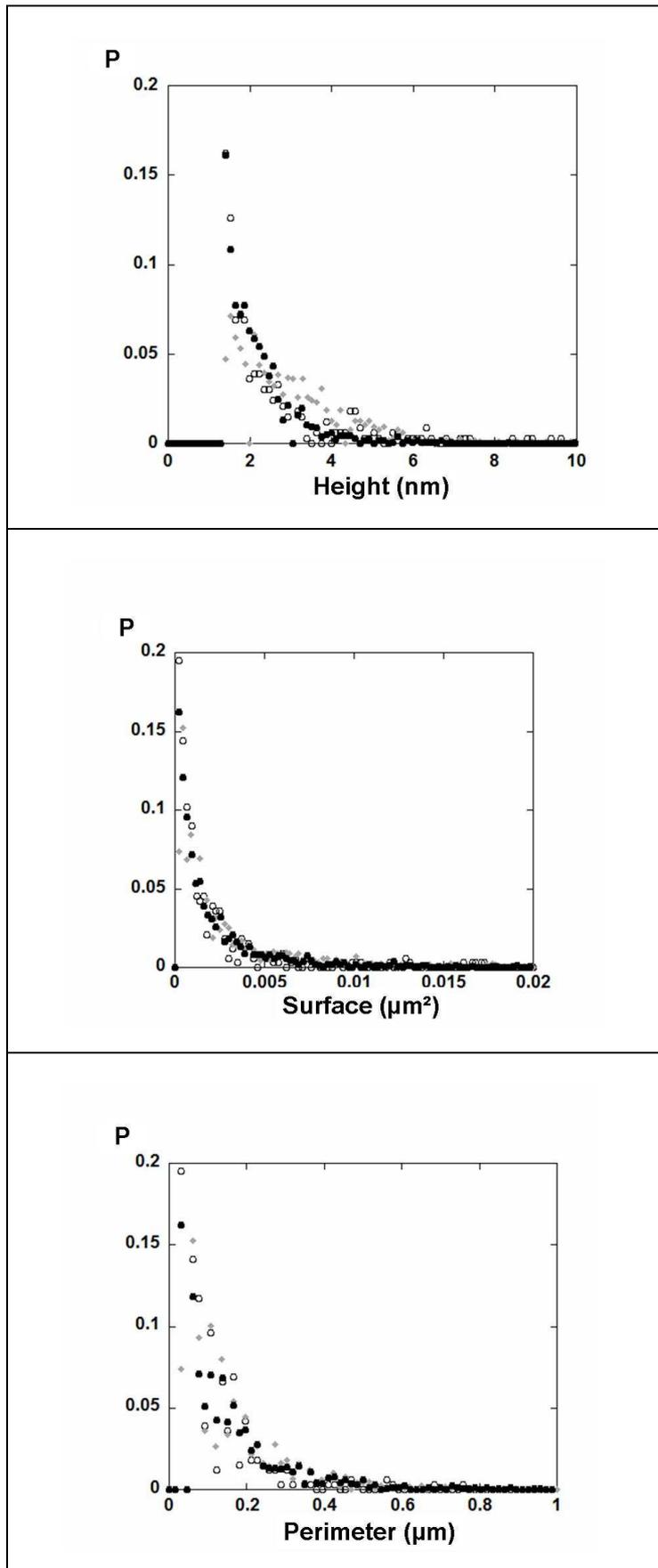


Figure 7 - Histogrammes normalisés de la hauteur, de la surface et du périmètre des objets pour : Apo A-I/DPPC (\circ), Apo A-I / DPPG(\bullet) : Seuil à 140 et Apo A-I / DOPC (\blacklozenge) : Seuil à 149 avec correction des hauteurs, pour une pression initiale de 15 mN/m.

2.3 Surface occupée par les particules protéiques sur les couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG

2.3.1 Etudes des couches pour une pression initiale de 30 mN/m

L'objectif de ce travail est de comparer, à partir des images AFM, la surface occupée par les particules formées par la protéine dans chacun des lipides que nous avons utilisé. Pour cela, nous avons sommé les surfaces prises par chaque objet à une hauteur donnée au dessus du lipide. Cette hauteur est la même quelque soit le lipide, afin que les sections des objets soient comparables. Le seuil utilisé est le NDG 140, ce qui correspond à une hauteur de 1.4 nm au dessus du lipide. Nous aborderons plus loin l'influence de l'épaisseur de la couche.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux couches mixtes Apo A-I / phospholipides où la pression avant l'injection de la protéine est de 30 mN/m (voir figure 8 et annexe 4). A cette pression, DPPC et DPPG sont entièrement en phase LC tandis que DOPC est entièrement en phase LE (voir chapitre 1 section 3.2.2). Nous comparons ainsi les surfaces occupées par les particules protéiques dans DOPC et dans DPPC pour obtenir une information concernant l'influence de la phase sur l'insertion de l'Apo A-I dans la couche de lipides. De même, nous comparons DPPC et DPPG pour obtenir une information concernant l'influence de la charge sur l'insertion de la protéine.

Lorsque la pression initiale de la couche de lipides est aussi élevée, la surface occupée par les particules protéiques est faible, inférieure à 1%, ainsi des imperfections, comme des impuretés ou des défauts dans la couche de lipides, peuvent en constituer une fraction importante. Nous avons donc mesuré la surface prise par ces imperfections dans une couche de lipides purs dont la pression est de 30 mN/m et nous nommons cette mesure : « surface résiduelle ». La surface occupée par les particules protéiques est alors obtenue en soustrayant la surface résiduelle à celle qui a été mesurée dans la couche mixte. Ces différentes valeurs sont affichées dans le tableau (tableau 1).

La surface prise par les particules formées par la protéine dans la couche de DOPC fut également mesurée avec un seuil plus élevé, correspondant au NDG 149 et pour lequel la hauteur vaut 1 nm de plus que pour le NDG 140, utilisé pour les mesures précédentes. Ce nouveau seuil permet de compenser la différence d'épaisseur entre les couches de lipides (voir section 2.1). Les résultats sont affichés dans le tableau 1.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

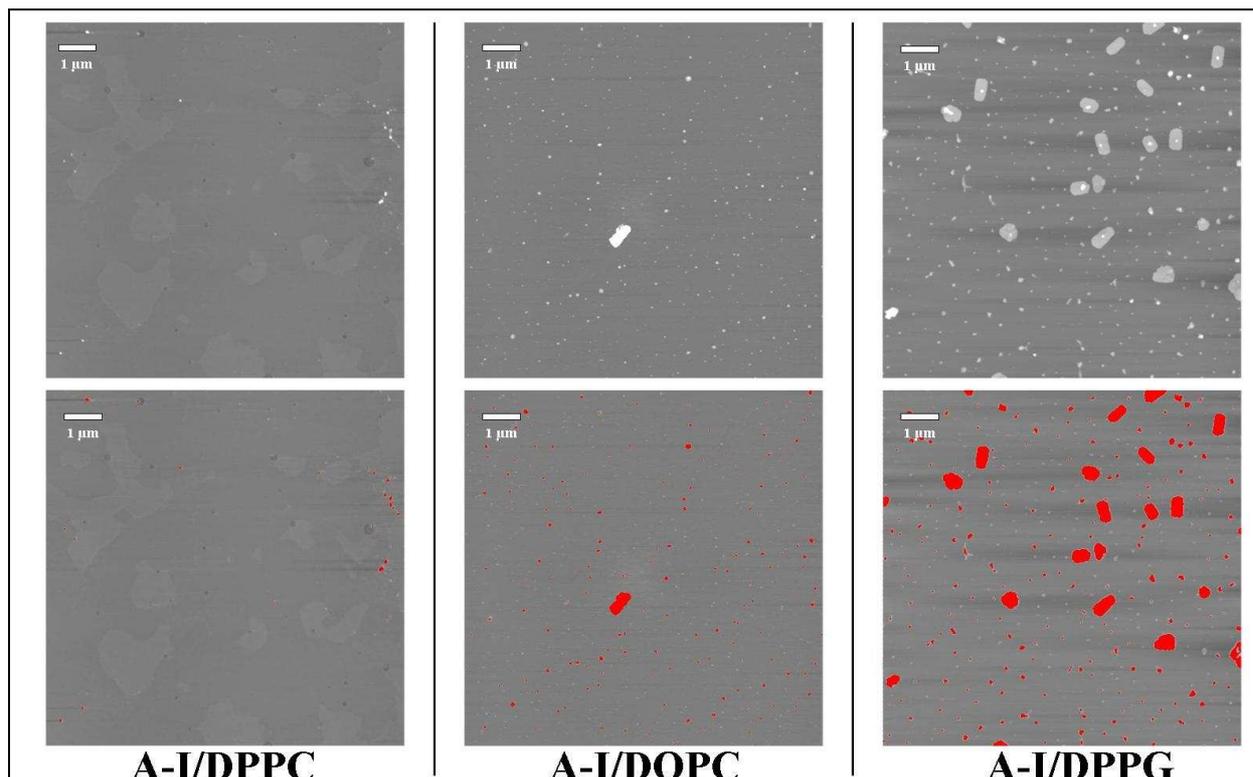


Figure 8 – Images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/DPPC, Apo A-I/DOPC et Apo A-I/DPPG, pour une pression avant injection de 30 mN/m (les hauteurs varient de -5 nm à $+5 \text{ nm}$). En bas, sur les mêmes images, les objets dont la hauteur est supérieure à 1.4 nm sont marqués en rouge.

Les valeurs moyennes nous indiquent que la surface totale occupée par les particules formées par l'Apo A-I est plus importante dans DPPG que dans DOPC et DPPC, avec 0.54% pour DPPG, 0.22% pour DOPC (0.11% pour un seuillage avec NDG 149) et moins de 0.05% pour DPPC. Elle est donc également plus importante dans DOPC que dans DPPC. Cependant, ces différences entre les mesures sont-elles significatives, ou s'agit-il uniquement de variations statistiques ? Pour répondre à cette question nous avons vérifié que les surfaces moyennes occupées dans les trois lipides ont une différence statistique significative (comparaisons de moyennes connaissant l'écart-type). Par l'intermédiaire d'un site Internet libre-accès permettant de comparer des échantillons gaussiens indépendants (<http://www.info.univ-angers.fr/~gh/wstat/compmoy.php>), nous avons confirmé l'hypothèse que la distribution des protéines est différente dans chacun des trois lipides : la probabilité que la répartition des protéines dans deux lipides différents soit obtenue à partir de la même fonction de distribution étant inférieure à 5% . Ceci est également vrai, si l'on considère les mesures de surface dans DOPC avec un seuil plus élevé (seuil à 149). Nous avons également étudié l'influence de la résolution latérale de l'image AFM, sur la mesure de la surface

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

occupée par les objets protéiques dans la couche de lipides. Ici la surface des pixels (environ 250 nm²) représente le facteur limitant de cette résolution, elle est prépondérante devant la convolution produite par la pointe AFM. Nous avons mis en évidence que l'incertitude créée par la résolution spatiale de l'image est négligeable devant l'écart type sur la distribution des surfaces (voir annexe 5).

Lorsque que l'on change de lipide (DPPC, DOPC, DPPG), la surface occupée par les particules créées par l'Apo A-I croît dans le même ordre que les pressions d'exclusion ($S_{DPPC} < S_{DOPC} < S_{DPPG}$), qui furent mesurées au chapitre 3 section 1.2. Nous avons donc un accord entre les mesures ellipsométriques, tensiométriques et les mesures réalisées au microscope AFM. Ceci confirme que cette protéine s'insère en plus grande quantité dans le lipide chargé négativement (DPPG) que dans les deux autres lipides qui sont zwitterioniques (DPPC et DOPC). Ces résultats confirment également l'existence d'une influence produite par la phase sur l'insertion de la protéine dans les lipides zwitterioniques, puisque les objets créés par la protéine occupe plus de place dans la phase LE (DOPC) que dans la phase LC (DPPC). L'influence de la phase des lipides est cependant clairement moins importante que celle de leur charge.

	Surface occupée sur couches mixtes (%)	Surface occupée sur phospholipides purs (%)	Surface occupée par les particules protéiques (%)
DPPC (30 mN/m)	0.10 +/- 0.04	0.10 +/- 0.02	< 0.05
DOPC (30 mN/m)	0.32 +/- 0.09	0.1 +/- 0.07	0.22 +/- 0.12
DPPG (30 mN/m)	0.79 +/- 0.34	0.25 +/- 0.24	0.54 +/- 0.42
DOPC (30 mN/m) NDG 149	0.19 +/- 0.08	0.08 +/- 0.07	0.11 +/- 0.11

Tableau 1 – Surfaces occupées par les objets sur les couches de phospholipides purs et sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides. Nous obtenons par soustraction la surface occupée par les particules protéiques. Les valeurs moyennes et les incertitudes (écart type) sont calculées sur au moins 8 images AFM et deux échantillons de couches mixtes (voir images sur figure 8 et images montrées dans l'annexe 4).

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

2.3.2 Etudes des couches pour une pression initiale de 15 mN/m

Les différences d'affinité de l'Apo A-I pour chacun des lipides étudiés ont été établies et l'influence de la charge et de la phase du lipide sur l'insertion de la protéine a été démontrée. Cependant, la phase semble n'avoir qu'un faible impact sur la quantité de protéines insérées dans la couche de lipides, puisque les données ellipsométriques et tensiométriques de DOPC et de DPPC sont très proches malgré leurs phases différentes. La microscopie AFM confirme également pour des couches mixtes dont la pression initiale est de 30 mN/m que la différence d'occupation créée par le changement de phase est plus faible que la différence obtenue par le changement de charge.

Pourtant un simple examen à l'œil des images AFM de couches mixtes réalisées avec des pressions initiales de 15 mN/m permet de constater que la protéine s'insère plus fortement dans DOPC, qui est en phase LE, que dans DPPC, qui est majoritairement en phase LC (voir figure 5 et annexe 4). Cette constatation montre d'une part que l'influence de la phase se voit mieux par la microscopie AFM que par l'ellipsométrie et la tensiométrie et d'autre part que cette influence augmente quand la pression du lipide avant injection est plus faible. Afin de mesurer de façon quantitative l'accroissement de cet effet de phase, nous avons mesuré la surface occupée par les particules créées par la protéine dans une couche de DPPC et dans une couche de DOPC pour une pression initiale de 15 mN/m. A cette pression, DPPC étant majoritairement en phase LC, la surface prise par les particules dans la phase condensée de ce lipide peut donc être comparée à la surface qu'elles occupent dans DOPC, ce dernier étant entièrement en phase LE. Comme précédemment, nous avons mesuré le taux d'occupation des particules dans DOPC avec deux seuils différents : l'un correspondant à une hauteur de 1.4 nm au dessus du lipide (NDG 140), qui est également utilisé pour DPPC, et l'autre correspondant à une hauteur de 2.4 nm (NDG 149) afin de compenser la différence d'épaisseur entre les couches de DPPC et de DOPC. Dans chaque cas, nous avons comme précédemment mesuré la surface résiduelle sur les couches de lipides purs. Les mesures sont affichées dans le tableau 2.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

	Surface occupée sur couches mixtes (%)	Surface occupée sur phospholipides purs (%)	Surface occupée par les particules protéiques (%)
DPPC (15 mN/m)	0.17 +/- 0.14	0.08 +/- 0.04	0.1 +/- 0.1
DOPC (15 mN/m)	1.64 +/- 0.51	0.31 +/- 0.03	1.33 +/- 0.51
DOPC (15 mN/m) NDG 149	0.94 +/- 0.27	0.08 +/- 0.07	0.86 +/- 0.28

Tableau 2 – Surfaces occupées par les objets sur les couches de phospholipides purs et sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides. Nous obtenons par soustraction la surface occupée par les particules protéiques. Les valeurs moyennes et les incertitudes (écart type) sont calculées sur au moins 6 images AFM pour les couches mixtes (voir images sur figure 5 et en annexe 4).

Nos mesures mettent clairement en évidence une influence plus forte de la phase lorsque la pression initiale du lipide est de 15 mN/m. Alors que la valeur obtenue dans la phase LC d'une couche mixte Apo A-I/DPPC reste proche de la surface résiduelle, avec une valeur de 0.1%, nous constatons un fort accroissement de la surface occupée dans DOPC. Celle-ci passe de 0.22%, pour une pression initiale de 30 mN/m, à 1.33% (0.86% si le NDG seuil vaut 149) pour cette pression là. Elle devient ainsi plus importante que la surface occupée dans DPPG pour une pression initiale de 30 mN/m (0.54%), quelque soit la hauteur du seuil pour DOPC. L'influence de la résolution de l'image AFM a une nouvelle fois été examinée et nous confirmons que celle-ci n'affecte pas les tendances que nous évoquons (voir annexe 5).

Nous rappelons que la différence d'insertion due à l'effet de charge sur les couches mixtes dont la pression initiale est de 30 mN/m se traduit par une différence nette entre les pressions d'exclusion pour DPPC et DPPG. Par ailleurs, comme nous l'avons expliqué précédemment les mesures ellipsométriques et tensiométriques sur DPPC et DOPC sont proches, la différence d'interaction entre Apo A-I - DPPC (phase LC) et Apo A-I - DOPC

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

(phase LE) est donc faible au regard de la différence d'interaction entre Apo A-I - DPPC (zwitterionique) et Apo A-I - DPPG (anionique).

Nous constatons ainsi une différence d'insertion forte entre DOPC et DPPC du fait que ce dernier soit majoritairement condensé. Cependant, nous pouvons identifier dans DPPC des zones LE avec une forte densité d'objets. Nous avons voulu estimer le rapport de la densité des objets dans ces zones sur leur densité en phase LC. Pour cela, on comptabilise le nombre d'objets dans la phase LE en seuillant à une hauteur de -0.3 nm au dessous de la partie condensée (NDG 125). En seuillant l'image à cette hauteur, les domaines condensés et les particules protéiques qui sont formées sur ces domaines apparaissent sous la forme de grandes zones de plusieurs centaines de pixels que nous pouvons facilement discriminer. Cette méthode permet de ne compter que les objets formés dans la phase LE. Cependant, avec cette méthode, nous comptabilisons également les domaines LC de petite taille formés dans cette phase. En effectuant la mesure au même seuil dans le lipide pur, nous déterminons que les domaines lipidiques sont situés à la hauteur de -0.35 nm (voir figure 9). Ainsi, nous éliminons du décompte les objets correspondant à cette hauteur, situés dans la phase LE des couches mixtes. Les mesures précédentes qui ont été effectuées en seuillant à 1.4 nm au dessus du lipide en zones condensées (NDG 140), donnent le nombre d'objets présents dans cette phase. En utilisant les deux seuillages, nous obtenons un rapport du nombre d'objets présents dans les zones LE sur le nombre de ceux qui sont présents dans les zones LC qui vaut 6.3. La différence de hauteur entre les deux phases permet un seuillage donnant la proportion de chacune de ces phases sur les images AFM. Nous mesurons alors le rapport de la surface prise par la phase LE sur la surface prise par la phase LC et nous trouvons une valeur de 0.14. **Ceci nous donne une densité d'objets au moins 40 fois plus forte dans la phase expansée que dans la phase condensée**, avec des résultats moyennés sur 6 images AFM. Nous rappelons que cette valeur est peut-être sous-estimée car nous excluons de la phase expansée les objets ressemblant aux domaines lipidiques de petite surface.

Ainsi, la différence dans l'insertion des protéines entre phase LE et phase LC constatée sur DPPC et DOPC semble également exister dans le cas d'une coexistence de phase impliquant des domaines LE de taille micrométrique. Mais seule une étude statistique de la répartition spatiale des objets sur les images AFM permettra de montrer quantitativement comment la coexistence de phase influence la distribution de la protéine par rapport à une distribution aléatoire. Cette étude est exposée au chapitre suivant.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

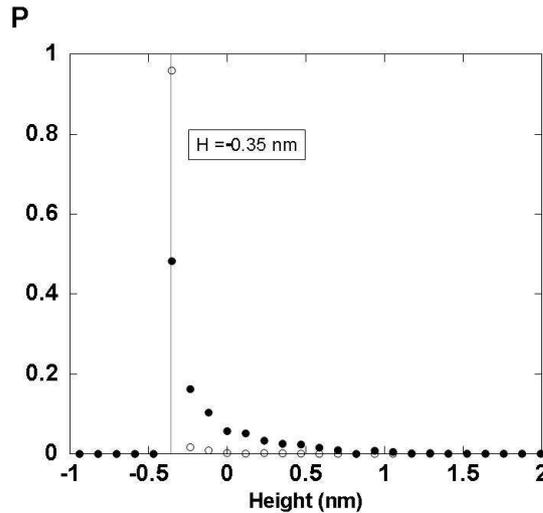
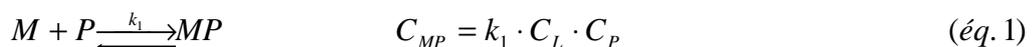


Figure 9 - Histogrammes normalisés de la hauteur des objets en phase LE pour DPPC pur (○) et pour Apo A-I / DPPC (●). On seuille avec NDG 125. Sur le lipide pur, les seuls objets visibles sont les domaines LC formés dans la phase LE, leur sommet est à -0.35 nm. Sur le lipide avec protéine, nous constatons qu'environ 50 % des objets sélectionnés pourraient être des domaines de phase LC. Ainsi, nous excluons les objets de cette hauteur quand nous comptons le nombre de particules créées par les protéines en phase LE sur la couche mixte.

2.4. Approche par un modèle classique d'auto-assemblage

Nous avons testé un modèle classique d'auto-assemblage, déjà utilisé sur des peptides mimant les hélices de l'Apo A-I (3), pour décrire la distribution de la surface des particules protéiques insérées dans la couche de lipides. Nous décrivons ci-dessous les deux étapes de ce modèle, qui sont la nucléation et la croissance des particules :

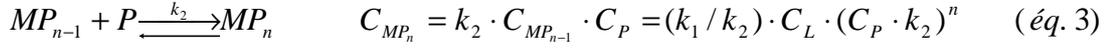
I- La nucléation : une protéine P se lie à la monocouche de phospholipides M, pour former un noyau MP, avec la constante de réaction k_1 .



Ici, C_P est la concentration de protéines en sous phase, C_L est la concentration de phospholipides et C_{MP} est la concentration de noyaux.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

2 – La croissance : les protéines se lient aux noyaux selon une constante de réaction k_2 , avec $k_2 > k_1$.



Ici, MP_n correspond à une particule de n protéines. L'équation 3 donne ainsi la concentration des particules en fonction de leur taille. Sachant que la surface S d'une particule est reliée à la surface S_0 d'une protéine et au nombre n de protéines constituant la particule par la relation suivante : $S = n \cdot S_0$, nous obtenons une relation sur la concentration des particules en fonction de leur surface, en réécrivant l'équation 3 de la façon suivante :

$$C_{MP_n} = (k_1 / k_2) \cdot C_L \cdot (C_P \cdot k_2)^{\frac{S}{S_0}}, \quad S = n \cdot S_0 \quad (\text{éq. 4})$$

Nous pouvons maintenant introduire la probabilité $P(S)$ d'obtenir une particule de surface S , dans l'équation 4. Ce qui nous donne la relation suivante :

$$P(S) = A \cdot C_{MP_n} = A \cdot (k_1 / k_2) \cdot C_L \cdot (C_P \cdot k_2)^{\frac{S}{S_0}} \quad (\text{éq. 5})$$

Où A est une constante de normalisation. Cependant, l'équation 5 peut être réécrite sous une forme simplifiée, qui est :

$$\ln(P(S)) = \alpha \cdot S + \beta \quad (\text{éq. 6})$$

$$\text{où } \alpha = \frac{\ln(C_P \cdot k_2)}{S_0} \quad \text{avec } k_2 = \frac{e^{\alpha S_0}}{C_P}$$

$$\text{et } \beta = \ln(A \cdot (k_1 / k_2) \cdot C_L)$$

Or nous avons accès expérimentalement à $P(S)$, qui correspond à la distribution normalisée de la surface des particules que nous avons mesuré sur les images AFM (voir section 2.3). Nous avons donc réalisé un ajustement de la distribution expérimentale, par l'équation 6. Ceci nous a permis d'une part, d'estimer la pertinence de ce modèle pour décrire la formation des particules protéiques et d'autre part d'obtenir une valeur de la constante de réaction k_2 .

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

Comme nous ne connaissons pas la valeur de S_0 dans nos lipides, nous avons approximé cette valeur par la surface occupée par une molécule d'Apo A-I à l'interface liquide/air. La concentration de matière par unité de surface à l'interface liquide/air, mesurée par ellipsométrie, vaut $\Gamma_{\text{liquid/air}}=1.4 \text{ mg/m}^2$, ce qui est en accord avec la valeur obtenue par Bolanos-Garcia et co-auteurs (4). Sachant que la masse moléculaire de l'Apo A-I est de 28 kDa, nous obtenons une surface moyenne pour chaque protéine située à l'interface liquide/air égale à 33.2 nm^2 . A titre de comparaison les mesures effectuées par Ibdah et Philips (5), par radioactivité de surface, donnent une surface moléculaire de 36.5 nm^2 (15 \AA^2 /résidu) pour l'Apo A-I à l'interface liquide/air, soit une différence par rapport à notre valeur d'environ 10%. L'erreur sur l'estimation de k_2 provoquée par l'approximation de la surface moléculaire de l'Apo A-I dans les couches de lipides par celle obtenue à l'interface liquide/air sera discutée ultérieurement.

Le nombre de particules insérées dans la phase LC du DPPC est trop faible pour analyser dans ces conditions la fiabilité du modèle. Nous avons donc réalisé cette analyse uniquement sur DOPC et DPPG. La figure 10 montre les résultats obtenus sur ces deux lipides quand nous réalisons l'ajustement de la distribution de $\ln(P(S))$ par l'équation 6. La valeur de R pour DOPC et DPPG est supérieure à 0.96, ce qui montre une bonne fiabilité du modèle pour décrire les distributions en surface de nos particules. Nous obtenons pour la pente α de la droite une valeur qui est environ $-462 \text{ }\mu\text{m}^2$ pour DOPC et $-478 \text{ }\mu\text{m}^2$ pour DPPG, ce qui donne dans les deux cas une valeur de la constante k_2 de $1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Nous avons utilisé pour ces calculs, l'aire moléculaire de l'Apo A-I à l'interface liquide/air, car nous n'avons pas accès à cette aire dans les couches de lipides. Nous allons donc maintenant estimer la variation produite sur la valeur de k_2 , par une modification de cette aire moléculaire. Si nous considérons que la surface de l'Apo A-I est 10 fois plus forte dans une couche de lipides, que dans une couche de protéines pure, nous obtenons une diminution de la valeur de k_2 d'environ 15% ($k_2 = 1.6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Par contre, si nous considérons que la surface de l'Apo A-I est 10 fois plus faible, la valeur de k_2 est alors pratiquement inchangée ($k_2 = 1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Il est raisonnable de dire que la modification de l'aire occupée par l'Apo A-I entre les différentes interfaces (liquide/air, liquide/DPPG et liquide DOPC) est plus faible qu'un facteur 10. En conséquence, la précision estimée sur k_2 est meilleure que 15 %, nous pouvons dès lors considérer que la constante k_2 de la réaction d'auto-association de l'Apo A-I a des valeurs similaires dans DOPC et DPPG.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

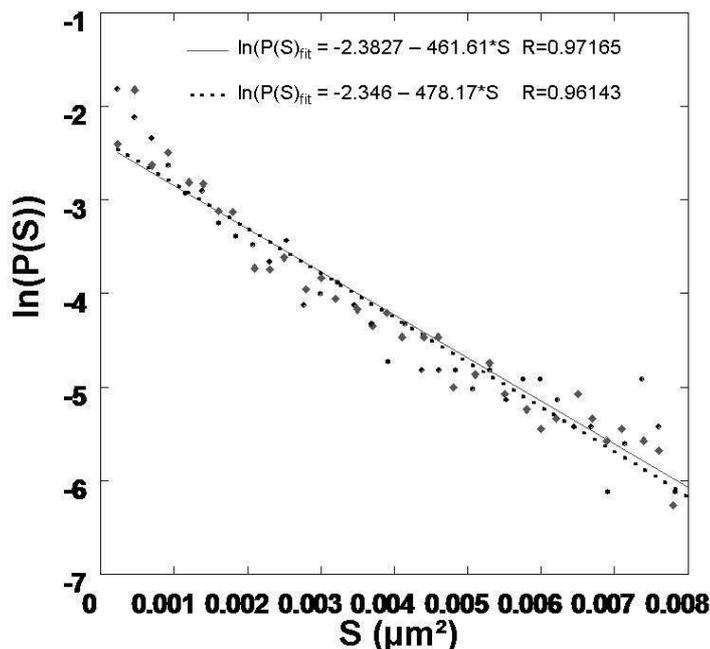


Figure 10 - Graphe du logarithme de la probabilité $P(S)$ d'obtenir un objet de surface S , en fonction de S . Les losanges gris représentent DOPC et les ronds noirs DPPG. En haut, nous avons les équations correspondant à l'ajustement de ces points par l'équation 6, pour DOPC (trait plein) et DPPG (trait en pointillé).

III. Etudes par spectroscopie PM-IRRAS

Des mesures PM-IRRAS ont été réalisées sur l'Apo A-I à l'interface liquide/air et à l'interface liquide/lipides, afin de déterminer la structure secondaire de cette protéine dans le contexte étudié.

3.1 Etudes de l'Apo A-I à l'interface liquide/air

Tout d'abord, nous avons caractérisé la protéine à l'interface liquide/air. La cuve utilisée n'étant pas prévue pour l'injection, dans ce cas uniquement, nous avons déposé un mélange tampon/Apo A-I dans la cuve en téflon.

Durant la cinétique d'adsorption de l'Apo A-I à l'interface liquide/air nous avons réalisé plusieurs spectres PM-IRRAS. La figure 11 présente les spectres de l'interface obtenus à différents instants de la cinétique : au début (22 minutes après le dépôt du mélange tampon /

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

Apo A-I), dès l'apparition d'un plateau sur la pression de surface (71 minutes après le dépôt) et à la fin de la cinétique (363 minutes après le dépôt), lorsque l'angle ellipsométrique et la pression de surface sont stables. Ces spectres ont été normalisés par le spectre de l'interface tampon/air, qui fut réalisé avant de déposer la solution de protéines dans la cuve.

Notre analyse des spectres fut ciblée sur la zone correspondant au mode de vibration amide I, localisée entre 1700 et 1600 cm^{-1} , et celle correspondant au mode de vibration amide II, localisée entre 1600 et 1500 cm^{-1} . Les informations obtenues sur ces modes de vibration permettent d'avoir accès à la structure secondaire de la protéine (voir chapitre 2 section 2.4). Nous avons situé les maxima d'intensité à des fréquences de 1655.6 cm^{-1} , pour la bande concernant l'amide I, et 1542.8 cm^{-1} , pour la bande concernant l'amide II. Etant donné que les intensités associées à ces pics augmentent au cours de la cinétique, alors nous savons que ce signal est bien produit par l'adsorption de la protéine à l'interface liquide/air. Les valeurs des fréquences associées à ces maxima sont caractéristiques d'une conformation en hélices α pour la protéine. Nous constatons la présence d'un deuxième pic sur la bande amide I, plus faible que le premier, entre 1700 et 1656 cm^{-1} . Ce pic pourrait être produit par la présence de feuilletts β antiparallèles ou par la présence de coudes dans la structure secondaire de la protéine. Comme ce deuxième pic n'est pas accompagné par un autre pic dans la zone située entre 1600 et 1655 cm^{-1} , alors ce signal n'est pas attribué à des feuilletts β antiparallèles, mais à des coudes.

En effectuant le rapport du maximum d'intensité de la bande de l'amide I sur le maximum d'intensité de la bande de l'amide II (RI/RII), nous obtenons une information concernant l'orientation des hélices α de la protéine par rapport à l'interface liquide/air (voir chapitre 2 section 2.4). La valeur de ce rapport est autour de 5 - 6 lors de l'apparition du plateau sur la pression de surface, ce qui correspond à un angle moyen entre les hélices α et la normale au plan de l'interface liquide/air supérieur à 80°. Dans ce cas les hélices sont pratiquement parallèles au plan de l'interface. Ce rapport décroît progressivement et vaut approximativement 3 à la fin de la cinétique. Cette valeur correspond à un nouvel angle moyen d'environ 60°, ce qui montre un redressement des hélices α en raison des interactions protéine - protéine.

Ainsi, l'Apo A-I s'organise à l'interface liquide/air dans une structure majoritairement formée d'hélices α . Ces hélices tendent à s'orienter parallèlement au plan de l'interface liquide/air, du fait de leur amphiphilicité, cependant les interactions protéine - protéine ont tendance à modifier cette orientation.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

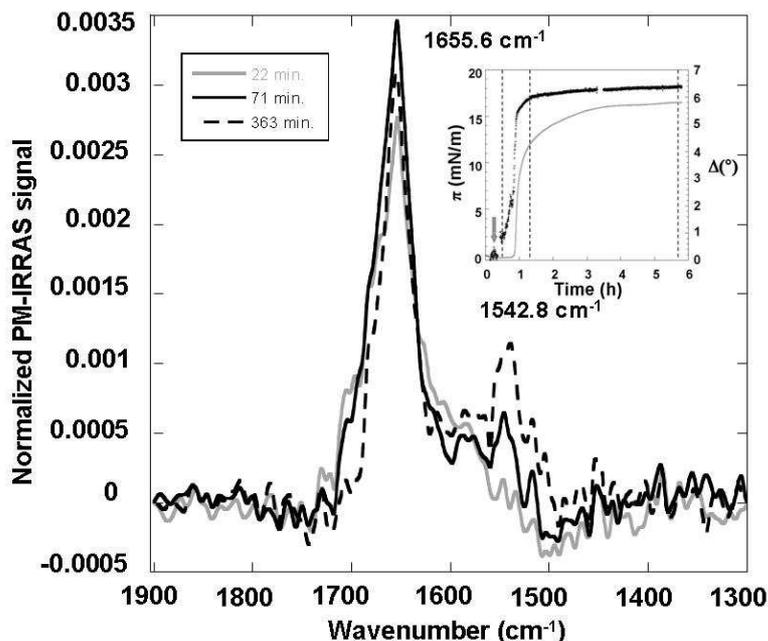


Figure 11 - Spectres PM-IRRAS de l'Apo A-I à l'interface liquide/air, normalisés par le spectre de l'interface tampon/air. Ces spectres ont été acquis à différents instants de la cinétique : 22 minutes (trait gris), 71 minutes (trait noir entier), et 363 minutes (fin de la cinétique) (trait noir en pointillés) après le dépôt du mélange tampon/Apo A-I dans la cuve. En insert : les mesures de l'angle ellipsométrique (trait noir) et de la pression de surface (trait gris) au cours du temps. Les instants où l'on a acquis les spectres sont indiqués par les traits verticaux.

3.2 Etudes de l'Apo A-I à l'interface liquide/lipides

Nous avons ensuite réalisé des mesures PM-IRRAS sur des couches mixtes Apo A-I / DPPC et Apo A-I/DPPG dont la pression initiale est de 20 mN/m. Les difficultés expérimentales¹ et la disponibilité du matériel, n'ont pas permis d'obtenir des spectres dans les conditions d'équilibre de la couche. Ainsi, nous avons choisi de présenter pour chaque lipide, un spectre acquis deux heures après l'injection de la protéine sous la couche de phospholipides. La figure 12 présente ces spectres, normalisés par ceux de l'interface liquide/DPPC ou liquide/DPPG, qui furent acquis juste avant l'injection de la protéine.

Le spectre de la couche mixte Apo A-I/DPPC montre un maximum en intensité dans la bande de l'amide I pour une fréquence de 1650.6 cm⁻¹. Par contre le signal est trop bruité

¹ Notamment liées à l'apparition de glace produite par le réchauffement du détecteur qui a rendu le signal ininterprétable sur un certain nombre de spectres.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

pour mettre en évidence la position du maximum dans la bande associée à l'amide II. La fréquence associée au maximum d'intensité dans la bande de l'amide I est caractéristique d'une conformation en hélices α de la protéine. Comme nous pouvons majorer l'intensité du signal sur la zone correspondant à l'amide II, le rapport d'intensité RI/RII peut ainsi être estimé approximativement à 3, ce qui correspond à un angle moyen entre les hélices α et la normale à l'interface de 60° . Cet angle est équivalent à l'angle obtenu à la fin de la cinétique de l'Apo A-I à l'interface liquide/air.

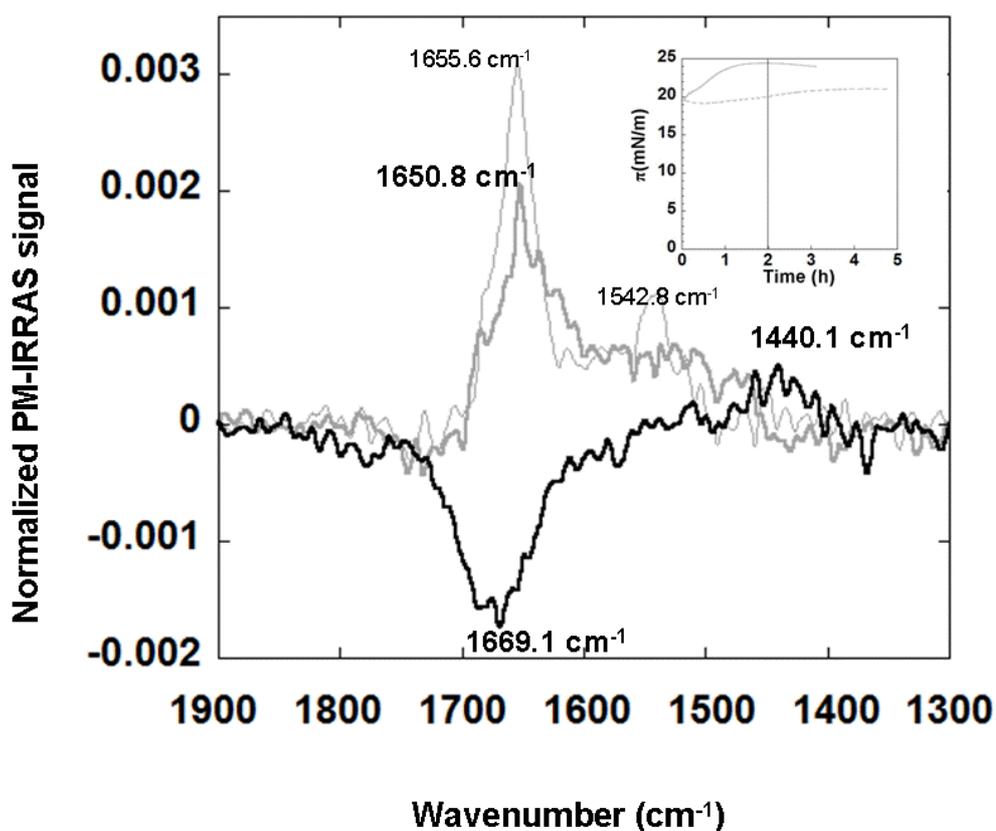


Figure 12 - Spectres PM-IRRAS des couches mixtes Apo A-I/DPPC (gris foncé) et Apo A-I/DPPG (noir), normalisés respectivement par le spectre de l'interface liquide/DPPC et liquide/DPPG. Ces spectres ont été acquis deux heures après l'injection de la protéine. Pour comparaison, nous montrons le spectre de la protéine à l'interface liquide/air (363 min. après début de la cinétique). En insert : mesure de la pression de surface au cours du temps, lorsque la protéine est injectée sous DPPC (trait en pointillés) et sous DPPG (trait plein). L'instant où l'on a acquis le spectre est indiqué par un trait vertical.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

Ainsi, les résultats sur DPPC montrent que l'Apo A-I conserve une structure en hélices α à l'intérieur des objets visibles sur les images AFM et que l'orientation des hélices n'est pas conditionnée uniquement par l'orientation de l'interface hydrophile/hydrophobe mais également par les interactions protéine - protéine ou protéine - lipides existant dans la couche.

Le spectre de la couche mixte Apo A-I/DPPG montre un creux vers 1669.1 cm^{-1} . Ce creux pourrait correspondre à un changement d'épaisseur optique de la couche, provoqué par le redressement des hélices qui deviendraient ainsi davantage perpendiculaires à l'interface liquide/DPPG. La présence d'un maximum d'intensité vers 1440.1 cm^{-1} a été observée, mais n'a pas pour l'instant d'explication.

Discussion/Conclusion du chapitre 3

Des travaux antérieurs sur cuve de Langmuir menés par Ibdah et Philips ont montré que l'Apo A-I s'insère entre les phospholipides, lorsque ceux-ci sont étalés à l'interface liquide/air et dans le cas où la tête polaire est la phosphatidylcholine (5). Cependant, aucune information n'indique quelle est l'organisation latérale de la protéine dans la couche. Nos mesures par ellipsométrie et tensiométrie confirment que la protéine insère une partie de ses résidus entre les phospholipides présents à la surface de la cuve, qu'ils soient zwitterioniques ou anioniques. De plus, par l'intermédiaire de la microscopie AFM, nous montrons que les molécules d'Apo A-I créent dans la couche de lipides des objets de taille nanométrique.

Cette étude est à notre connaissance la première étude réalisée par microscopie AFM sur des monocouches mixtes Apo A-I/phospholipides. Nous avons étudié l'influence de la phase et de la charge du lipide sur la forme des objets créés dans la couche. Notre travail montre que la géométrie de ces particules est peu influencée par ces paramètres. Les variations géométriques entre les particules insérées dans DPPC, DOPC et DPPG restent faibles, avec ou sans correction de la différence d'épaisseur entre les couches de lipides. Les mesures par spectroscopie PM-IRRAS montrent que la protéine adopte une structure en hélices α à l'intérieur de ces objets, sur une couche de DPPC. Nos résultats sont ainsi en accord avec ceux d'autres auteurs (6) et la structure secondaire de l'Apo A-I au sein de ces objets est proche de celle adoptée par la protéine dans son contexte biologique (7).

Les mesures PM-IRRAS suggèrent un redressement des hélices perpendiculairement à l'interface lorsque la protéine est insérée dans DPPG. Cette observation est à relier à nos

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

données ellipsométriques. La différence d'insertion d'un lipide à l'autre, mise en évidence par AFM, ne peut pas expliquer la forte différence dans la variation de l'angle ellipsométrique entre DPPG et les deux autres lipides. En effet, les mesures ellipsométriques entre DPPC et DOPC sont proches, malgré une forte différence, mesurée par AFM, dans la quantité de protéines insérée dans les couches de ces deux lipides. Ce comportement suggère une organisation différente de la protéine dans la couche de DPPG par rapport à DPPC et DOPC, ce qui est en accord avec les mesures PM-IRRAS. Ainsi, ces résultats montrent d'une part, que l'organisation de la protéine n'est pas la même d'un lipide à l'autre, dans la mesure où les hélices α semblent être plus proches de la normale à l'interface dans le DPPG que dans les deux autres lipides, d'autre part, que ce changement d'organisation affecte peu la forme des objets créés par la protéine (quand nous les observons avec la résolution de nos images AFM).

L'analyse effectuée sur la géométrie des objets distribués sur les couches de lipides, donne des informations sur la formation de ces objets. Nous avons ainsi comparé la distribution expérimentale de la surface (la section) des particules créées par la protéine à la distribution obtenue selon un modèle classique d'auto-assemblage (3), avec une étape de nucléation dans la couche de phospholipides puis une étape de croissance de la particule. Un bon accord est observé entre le modèle théorique et l'expérience pour les deux lipides testés, DOPC et DPPG. Ceci montre que la valeur de k_2 reste constante quand la surface n des particules augmente. Ainsi, nous constatons qu'il n'existe pas de taille particulière pour laquelle les objets formés ont une stabilité plus grande que pour les autres. La constante de réaction k_2 de la croissance des particules est la même pour les deux lipides, elle vaut $1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Les interactions hélice - hélice ne sont donc ni modifiées par le changement de lipide, ni par une éventuelle réorientation des hélices. La mesure de la valeur de k_2 par une méthode classique (3) permettrait une nouvelle validation de ce modèle d'auto-assemblage.

La mesure de cette constante de liaison a été effectuée par Spuhler et co-auteurs sur des peptides mimant les hélices de l'Apo A-I, avec des valeurs de $1.8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (peptide 18R) et $8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (peptide 18A) (3). Cette constante est clairement plus forte dans nos résultats avec l'Apo A-I. Ceci laisse supposer que la protéine s'associe en utilisant plusieurs hélices.

Nous avons également étudié l'affinité de l'Apo A-I pour la couche de phospholipides en fonction de la phase et de la charge du lipide. Ainsi, les mesures de l'angle ellipsométrique, de la pression de surface et de la surface occupée par les particules protéiques dans la couche de lipides sur les images AFM mettent en évidence une insertion et une interaction plus forte pour le lipide anionique (DPPG) que pour les deux autres lipides zwitterioniques (DPPC et DOPC). Elles mettent également en évidence une insertion plus forte de la protéine dans la

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

phase LE des lipides zwitterioniques que dans leur phase LC. Pour finir, ces mesures révèlent que l'influence de la charge du lipide sur son interaction avec la protéine est clairement plus forte que celle de sa phase. Les influences de la phase et de la charge du lipide furent déjà mises en évidence par d'autres auteurs (5, 8) sans toutefois quantifier la différence qui existe dans leur ampleur.

Les résultats que nous venons d'énoncer montrent un bon accord entre les études statistiques sur l'organisation de la protéine dans la couche de lipides réalisées par microscopie AFM et les études menées à l'échelle macroscopique par ellipsométrie et tensiométrie. Cependant, nous constatons que les données ellipsométriques et tensiométriques de DOPC et DPPC sont très proches alors que les images AFM révèlent une forte différence entre ces lipides au niveau de la quantité de protéines insérée, notamment pour des couches dont la pression initiale est de 15 mN/m. Ainsi, la plus ou moins grande quantité de protéines insérée dans la couche de lipides influe peu sur la pression de surface et sur l'angle ellipsométrique, qui sont des paramètres très sensibles à l'organisation de la couche. Cette observation indique que lors de l'insertion de l'Apo A-I dans une couche de phospholipides à tête polaire phosphatidylcholine, l'énergie impliquée dans le changement conformationnel de la protéine et dans ses interactions avec les lipides est faible. Or, Derksen et co-auteurs ont suggéré que l'insertion de l'Apo A-I dans une couche de DPPC en phase LE favoriserait la déshydratation de la couche de lipide et entraînerait ainsi un gain d'entropie pour les molécules d'eau (9). Ainsi, en comparaison de l'interaction électrostatique entre l'Apo A-I et DPPG, l'interaction de la protéine avec une couche de lipides zwitterioniques semble effectivement faible. Nous en concluons que le fait que la quantité de protéines insérée dans la phase LE soit plus grande que dans la phase LC des lipides zwitterioniques pourrait être due à la plus forte hydratation de cette phase.

Nous avons annoncé que les différences d'affinités pour la phase et la charge du lipide étaient visibles sur l'organisation microscopique de la protéine, dans la mesure où la surface totale occupée par les particules protéiques dans la couche de lipides dépend de ces affinités. Or, nous pouvons ajouter qu'en présence de coexistence de phases dans DPPC, la différence d'affinité semble conservée. En effet, la densité de particules créées par les protéines à l'intérieur des domaines LE est 40 fois plus forte que dans la phase LC. Cependant, seule une étude statistique sur la répartition spatiale de ces particules peut nous indiquer si la distribution des phases est seule responsable de leur distribution apparemment non aléatoire dans DPPC.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

Bibliographie du chapitre 3

1. Bottier, C., J. Géan, B. Desbat, A. Renault, D. Marion, and V. Vié. 2008. Structure and Orientation of Puroindolines into Wheat Galactolipid Monolayers. *Langmuir* 24:10901-10909.
2. Trudel, E., S. Beaufils, A. Renault, R. Breton, and C. Salesse. 2006. Binding of RPE65 Fragments to Lipid Monolayers and Identification of Its Partners by Glutathione S-Transferase Pull-Down Assays. *Biochemistry* 45:3337-3347.
3. Spuhler, P., G. M. Anantharamaiah, J. P. Segrest, and J. Seelig. 1994. Binding of apolipoprotein A-I model peptides to lipid bilayers. Measurement of binding isotherms and peptide-lipid headgroup interactions. *J. Biol. Chem.* 269:23904-23910.
4. Bolanos-Garcia, V. M., A. Renault, and S. Beaufils. 2008. Surface Rheology and Adsorption Kinetics Reveal the Relative Amphiphilicity, Interfacial Activity, and Stability of Human Exchangeable Apolipoproteins. *Biophys J.* 94:1735-1745.
5. Ibdah, J. A., and M. C. Phillips. 1988. Effects of Lipid Composition and Packing on the Adsorption of Apolipoprotein A-I to Lipid Monolayers. *Biochemistry* 27:7155-7162.
6. Castano, S. 1998. Etude physico-chimique de peptides amphipathiques en interaction avec des membranes biologiques et modèles. Une approche par spectroscopies de fluorescence, PM-IRRAS et par dynamique moléculaire. Thèse de doctorat de l'Université Bodeaux I.
7. Franck, P. G., and Y. L. Marcel. 2000. Apolipoprotein AI : Structure-Fonction Relationship. 41:853-872.
8. Lecompte, M. F., A. C. Bras, N. Dousset, I. Portas, R. Salvayre, and M. Ayrault-Jarrier. 1998. Binding Steps of Apolipoprotein A-I with Phospholipid Monolayers: Adsorption and Penetration. *Biochemistry* 37:16165-16171.
9. Derksen, A., D. Gantz, and D. M. Small. 1996. Calorimetry of apolipoprotein-AI binding to phosphatidylcholine-triolein-cholesterol emulsions. *Biophys. J.* 70:330-338.

Chapitre 3 - Influence de la charge et de la phase des phospholipides sur l'interaction Apo A-I/phospholipides

CHAPITRE 4

Distribution spatiale des particules créées par l'Apo A-I dans la couche de lipides

L'objectif de ce travail est de comprendre les mécanismes responsables de la répartition spatiale des objets créés par l'Apo A-I sur les trois couches de lipides. Quelle est l'influence de la distribution des phases dans le lipide zwitterionique DPPC et dans le lipide anionique DPPG? Existe-t-il des interactions entre les objets formés par la protéine? Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé plusieurs outils statistiques : la fonction de corrélation $g(r)$ qui représente la variation locale de la densité des particules par rapport à leur densité moyenne sur l'image, la fonction $D(r)$ qui sonde les distances entre premiers voisins et la fonction $V(r)$ qui fournit une information sur la taille occupée par les vides.

I. Analyse statistique de la distribution spatiale des particules protéiques

1.1 Les fonctions de distribution

Après avoir caractérisé la forme des objets produits par la protéine dans la couche de lipides, nous nous sommes intéressés à leur distribution spatiale. Au paragraphe précédent, nous avons vu qu'il est possible d'extraire les coordonnées X et Y du centre de chaque objet présent sur l'image. Nous allons maintenant caractériser la distribution des centres de ces objets en utilisant trois paramètres (1, 2) :

1°) La fonction de corrélation de paire $g(r)$, qui est reliée à ρ et à $P(r)$ par l'équation suivante (1) :

$$P(r) = g(r)\rho^2 dA_1 dA_2 \quad (\text{éq. 1})$$

ρ étant la densité moyenne d'objets par unité de surface et $P(r)$ étant la probabilité de trouver une distance r entre les centres de deux disques virtuels de surface dA_1 et dA_2 , qui seraient tous les deux occupés par l'un de ces objets. Ainsi, l'étude statistique avec $g(r)$ nous donne, à une distance r d'une particule, la variation de la densité locale des particules par rapport à leur densité moyenne.

2°) La fonction $D(r)$ qui décrit la probabilité d'obtenir la distance r entre un objet sur l'image et l'objet voisin le plus proche.

3°) La fonction $V(r)$ qui décrit la probabilité d'obtenir la distance r entre un point distribué au hasard sur l'image et l'objet créé par la protéine le plus proche de lui. Cette fonction permet d'estimer la largeur des zones où les particules formées par la protéine sont absentes.

Si nous représentons les objets formés par la protéine par des points distribués aléatoirement sur l'image (distribution de Poisson), la fonction de corrélation est égale à 1 pour toute valeur de r . Dans ce cas là, la fréquence d'apparition d'une distance r entre un point distribué aléatoirement sur l'image et le premier objet situé à sa proximité (estimation de $V(r)$) est la même qu'entre deux objets plus proches voisins (estimation de $D(r)$). Les fonctions $D(r)$ et $V(r)$ sont donc identiques (1, 2) et définis selon l'équation suivante :

$$D_P(r) = V_P(r) = 1 - \exp(-\pi\rho r^2) \quad (\text{éq. 2})$$

Par contre, dans le cas d'une distribution non aléatoire, $g(r)$ sera supérieure ou inférieure à 1, pour certaines valeurs de r , et les fonctions $D(r)$ et $V(r)$ seront différentes.

Dans le cas d'une distribution regroupée d'objets, les distances entre premiers voisins sont plus courtes, donc $D(r)$ est plus forte pour les faibles valeurs de r que dans le cas d'une distribution aléatoire. Par contre, les espaces vides sont plus larges, $V(r)$ est alors plus faible pour les faibles valeurs de r (2, 3). Dans le cas d'une distribution régulière d'objets, les distances entre les premiers voisins correspondent à une valeur caractéristique et les fluctuations autour de ces valeurs sont faibles, ainsi, $D(r)$ augmente moins rapidement avec r

que dans le cas d'une distribution aléatoire et comme les espaces vides de grande taille sont moins fréquents, $V(r)$ augmente plus rapidement avec r (2, 3).

1.2 Les méthodes d'estimation

L'expérimentation ne nous permet pas d'avoir accès directement aux valeurs de ces fonctions de distribution, puisque ceci nécessiterait de prendre en compte une distribution d'objets sur un plan infini. Les fonctions de distribution sont donc estimées sur les images AFM des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/phospholipides, qui ne sont que des échantillons de la distribution réelle des objets étudiés. Ainsi, nous obtenons une valeur expérimentale ρ^* , qui correspond à la densité moyenne de particules par unité de surface sur l'image AFM prise en compte, au lieu de la densité ρ décrite précédemment. Le calcul de ces fonctions de distribution est réalisé grâce à des programmes en Fortran conçus par Gérard Le Caër (Institut de Physique de Rennes – « Equipe Granulaire – Mousse »).

Ainsi, la fonction de corrélation est obtenue à l'aide de l'estimateur $g_\delta(r)$, appelé estimateur de Fiksel (4-9) et défini par l'équation suivante :

$$g_\delta(r) = \frac{1}{\rho^* 2} \sum_{\vec{x}_i} \sum_{\vec{x}_j \neq \vec{x}_i} \frac{f_\delta\left(\left\|\vec{x}_j - \vec{x}_i\right\| - r\right)}{2\pi \left\|\vec{x}_j - \vec{x}_i\right\| A\left(W_{\vec{x}_i} \cap W_{\vec{x}_j}\right)} \quad (\text{éq. 3})$$

Dans cette équation, $W_{\vec{x}_i}$ correspond à une fenêtre carrée d'une largeur a , qui est celle de l'image AFM, et dont le centre \vec{x}_i est la position de la particule i , ainsi $A\left(W_{\vec{x}_i} \cap W_{\vec{x}_j}\right)$ correspond à l'aire prise par l'intersection de deux fenêtres l'une centrée sur la particule numéro i et l'autre centrée sur la particule numéro j . La sommation dans l'équation 3 s'effectue sur les centres de l'ensemble des particules visibles sur l'image seuillée. La fonction f_δ , appelée noyau d'Epanechnikov (4-6), est définie par l'équation suivante :

$$f_\delta(r) = \frac{3}{8\sqrt{5}\delta} \left\{ 1 - \frac{r^2}{5\delta^2} + \left| 1 - \frac{r^2}{5\delta^2} \right| \right\} \quad (\text{éq. 4})$$

La valeur du paramètre de bande passante δ a été estimée¹ à $0.06/\rho$.

La fonction de distribution $D(r)$ est obtenue à partir d'un estimateur $D_1(r)$, décrit par Hanisch (10). Cet estimateur est défini par les relations suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} D_*(r) = \sum_{\vec{x}_i} \frac{1_{W(d_i)}(\vec{x}_i) \cdot 1_{[0,r]}(d_i)}{A(W(d_i))} \\ D_1(r) = \frac{D_*(r)}{D_*(R)} \quad 0 \leq r \leq R \end{array} \right. \quad (\text{éq.5})$$

Ici, \vec{x}_i détermine toujours la position de la particule i et d_i est la distance entre la particule i et sa plus proche voisine. La fonction $1_{[0,r]}(d_i)$ renvoie la valeur 1 si d_i est inférieure à r et 0 sinon. Cependant, l'image AFM n'étant qu'un échantillon du film interfacial étudié, il est possible qu'au delà des bords de l'image, il existe une particule éloignée de la particule i d'une distance d_i' , telle que d_i' soit inférieure à d_i . Pour éliminer cet effet qui induirait une erreur sur la statistique, nous ne tiendrons compte de la particule i , que si celle-ci se situe à une distance supérieure ou égale à d_i du bord de l'image (voir figure 1). Sur l'image AFM, de largeur a , cette particule devra ainsi se situer dans une fenêtre $W(d_i)$ de largeur $a-2d_i$ et de surface $A(W(d_i)) = (a-2d_i)^2$. Nous exprimons cette condition par la fonction $1_{W(d_i)}(\vec{x}_i)$ qui renvoie la valeur 1 si la particule i est positionnée dans cette fenêtre et 0 sinon.

¹ Des études antérieures ont été menées sur la distribution des centres de gravité des cellules, pour différents types de structures cellulaires planaires et pour des processus simulés tels qu'une distribution de Poisson ou une distribution aléatoire de disques (interactions stériques possibles).

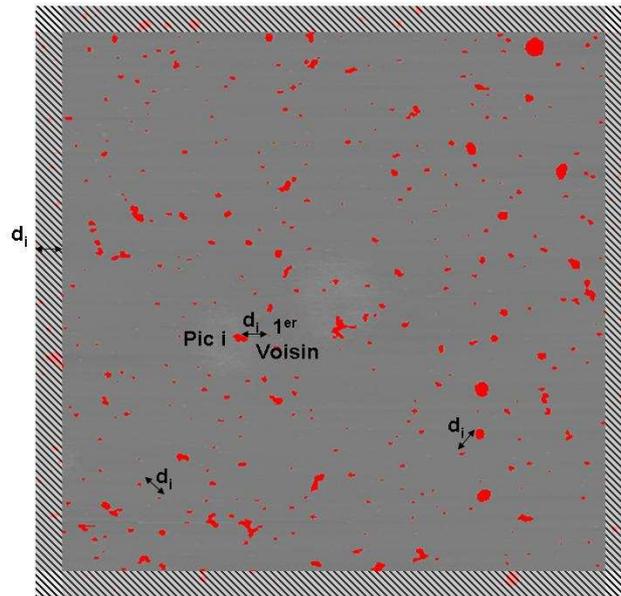


Figure 1- Principe de l'estimation de $D(r)$, pour chaque valeur de r on compte le nombre d'objets qui répondent aux deux conditions : 1°) avoir un objet premier voisin situé à une distance inférieure à r , 2°) être situé dans la fenêtre délimitée par les bordures hachurées.

Un estimateur fut proposé par Ripley pour évaluer la fonction de distribution $V(r)$ (11). Le principe consiste à diviser l'image en un nombre n_s de cellules identiques et à positionner un point aléatoirement dans chacune d'elles. Pour chaque point, on calcule la distance d_s entre lui et la particule la plus proche, ainsi que la distance r_s entre lui et le bord de l'image le plus proche. $V(r)$ est finalement estimé grâce à la relation suivante :

$$V(r) = \frac{N(d_s \leq r \leq r_s)}{N(r \leq r_s)} \quad (\text{éq. 6})$$

où $N(d_s \leq r \leq r_s)$ et $N(r \leq r_s)$ correspondent aux nombres de points satisfaisant respectivement les conditions $d_s \leq r \leq r_s$ et $r \leq r_s$. La condition $r \leq r_s$ permet comme dans le cas de l'estimation de $D(r)$ de s'affranchir des effets de bord.

L'ensemble de ces estimateurs ont été validés sur des simulations de processus de Poisson (distribution de points) ou de disques durs.

II. Distribution des particules formées par l'Apo A-I sur la couche mixte Apo A-I/DOPC

Pour commencer notre étude, nous avons analysé la distribution spatiale des particules situées sur un prélèvement de couche mixte Apo A-I/DOPC, dont la pression initiale est de 15 mN/m. Dans ce cas là, seule une interaction entre les particules protéiques peut faire en sorte que leur répartition ne soit pas aléatoire, puisque ce lipide ne possède qu'une seule phase (phase LE).

En estimant les fonctions $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ décrites précédemment, nous avons comparé trois distributions, pour chaque image AFM étudiée :

1°) La distribution expérimentale des particules sur l'image AFM. Celle-ci a été réalisée à partir de la position des particules sur l'image seuillée à une hauteur de 0.2 nm (NDG 130) au dessus du lipide². Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{Exp}$, $D(r)_{Exp}$ et $V(r)_{Exp}$.

2°) Une distribution simulée de points, de surface nulle, sur une image de la taille de l'image AFM. Cette distribution suit une loi de Poisson (distribution aléatoire) et la densité de points utilisée comme paramètre de la simulation correspond à la densité de particules sur l'image AFM. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_P$, $D(r)_P$ et $V(r)_P$

3°) Une distribution simulée de disques « durs », de surface non nulle, sur une image de la taille de l'image AFM. Ces disques subissent une distribution aléatoire et ne peuvent en aucun cas s'interpénétrer (d'où l'appellation disques « durs »). Cette situation peut conduire, si le nombre de disques le permet, à l'apparition d'interactions stériques. La densité de disques sur l'image correspond à la densité de particules sur l'image expérimentale. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_H$, $D(r)_H$ et $V(r)_H$.

Les distributions simulées sont créées à partir d'un programme en Fortran avec un algorithme de type Monte Carlo, conçu par Gérard Le Caër (Institut de Physique de Rennes – « Equipe Granulaire – Mousse »). Les surfaces des disques distribués sur l'image sont générées avec une distribution aléatoire de leur diamètre. La loi statistique utilisée a été

² Nous avons utilisé pour cette étude des images où le lipide est le plus homogène possible (peu d'artéfacts créés par la pointe de l'AFM ou par les traitements post acquisition...). Ceci, afin que nos mesures sur la distribution des particules protéiques ne soient pas affectées par les hétérogénéités du lipide. Par la même occasion on peut abaisser le NDG seuil à 130, au lieu de 140 pour les études précédentes.

obtenue par un ajustement numérique³ de la distribution expérimentale du diamètre des particules, réalisé sur 6 images AFM (voir annexe 4) et exposé sur la figure 2.

Pour l'image présentée sur la figure 3, nous montrons sur la figure 4 les résultats concernant la distribution expérimentale et les distributions simulées de points et de disques. L'étude statistique a ainsi été réalisée sur les 1310 objets sélectionnés sur cette image et des tests de reproductibilité ont été réalisés sur trois autres images AFM.

Nous constatons que les fonctions de corrélation $g(r)$, figure 4-C, des trois distributions sont très semblables, ce qui montre l'absence d'interactions à longues distances entre les objets formés par l'Apo A-I.

Pour $D(r)$, figure 4-A, il existe également un bon accord entre les trois calculs. Cependant, nous constatons que les distributions de points et de disques sont plus proches entre elles que de la distribution expérimentale. Cette différence est produite par des interactions de courtes distances, qui semblent toutefois plus longues que les interactions stériques. Nous supposons que ces interactions sont provoquées par une sous-estimation de la surface des objets. Quand nous seuillons cette image, nous réalisons une section des objets à une hauteur de 0.2 nm au dessus du lipide. A cette hauteur, la section de la particule a une surface plus faible qu'à sa base. Nous constatons également que sur la simulation des disques et sur la distribution expérimentale, il n'existe aucun premier voisin pour une distance inférieure à 2 pixels, contrairement à la distribution de points. Ceci est lié à la résolution des images AFM. En effet, quand deux pixels se touchent nous considérons qu'ils forment un objet unique, il n'est donc pas possible de voir une distance séparant le centre de deux objets qui soit inférieure à 2 pixels. Cet effet affecte le calcul de $D(r)$ pour la répartition des particules sur l'image AFM et aussi pour la répartition des disques, car leurs surfaces sont créées à partir d'une loi de distribution empirique obtenue sur les images AFM.

Nous obtenons également un bon accord entre les trois distributions dans le cas de $V(r)$, figure 4-B. Nous constatons que la distribution expérimentale passe au dessus de la distribution de disques durs. Cet effet est en accord avec le comportement observé sur $D(r)$ et indique une légère tendance à l'organisation due à l'influence des interactions stériques. Nous attribuons une nouvelle fois la différence entre le modèle des disques durs et la distribution expérimentale à une sous estimation de la surface des particules protéiques. Ceci montre

³ L'analyse de la distribution spatiale ayant été réalisée avant l'étude du modèle d'auto-assemblage, l'ajustement est réalisé à partir d'un modèle numérique proche des mesures, mais qui n'est pas celui exposé au chap. 3, éq. 6.

l'absence d'interactions à longues distances et l'existence d'interactions stériques entre ces particules.

Nous montrons ici que les objets créés par la protéine sont distribués dans la couche de DOPC de manière aléatoire. Les seules interactions existant entre eux semblent être des interactions stériques, puisque l'hypothèse de l'existence d'interactions à longue portée est maintenant éliminée.

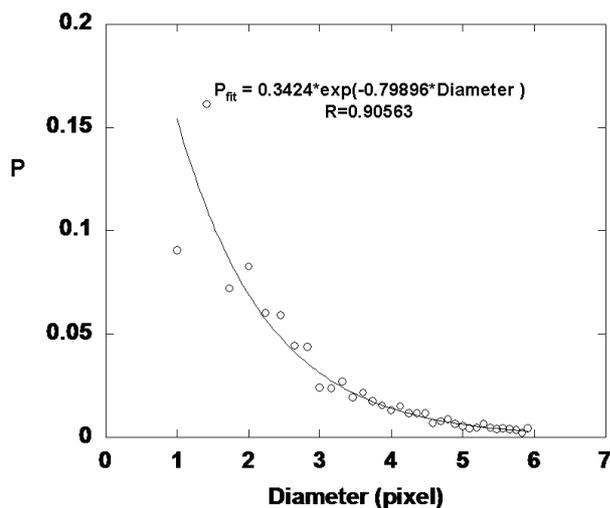


Figure 2 - Histogramme de la probabilité $P(D)$ d'obtenir un objet de diamètre D sur les images AFM de couches mixtes Apo A-I/DOPC, avec une pression initiale de 15 mN/m. Cet histogramme a été réalisé sur 6 images AFM (2065 particules). La loi de distribution pour la simulation des disques a été obtenue grâce à l'ajustement numérique de la distribution expérimentale (P_{fit}).

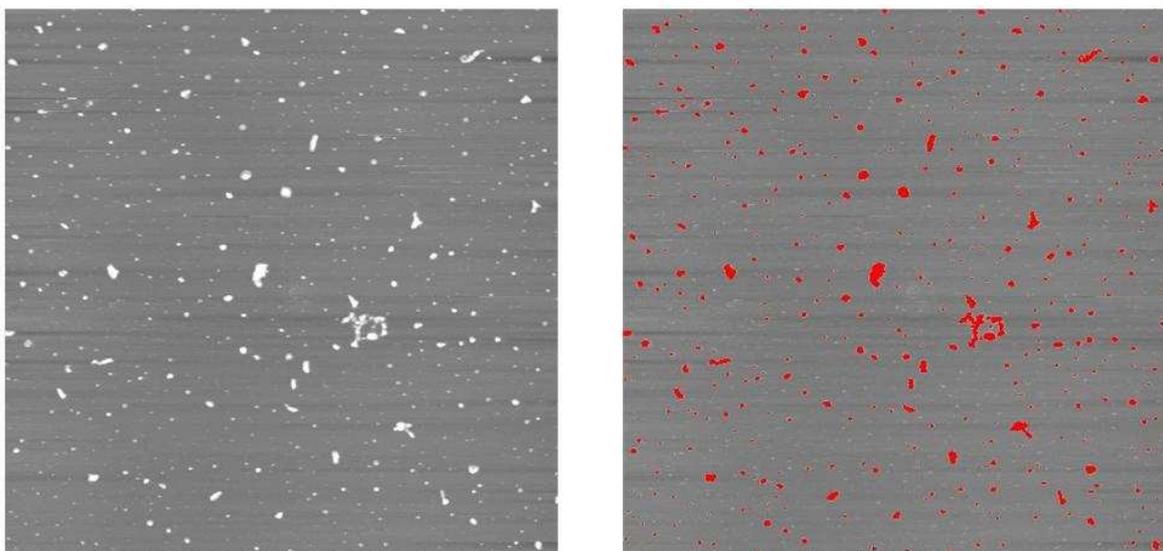


Figure 3 - A gauche, une image AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) du prélèvement de la couche mixte Apo A-I / DOPC (pression initiale : 15 mN/m) sur laquelle a été effectuée l'analyse de la distribution spatiale présentée sur la figure 4. A droite, sur la même image, les objets sélectionnés sont marqués en rouge.

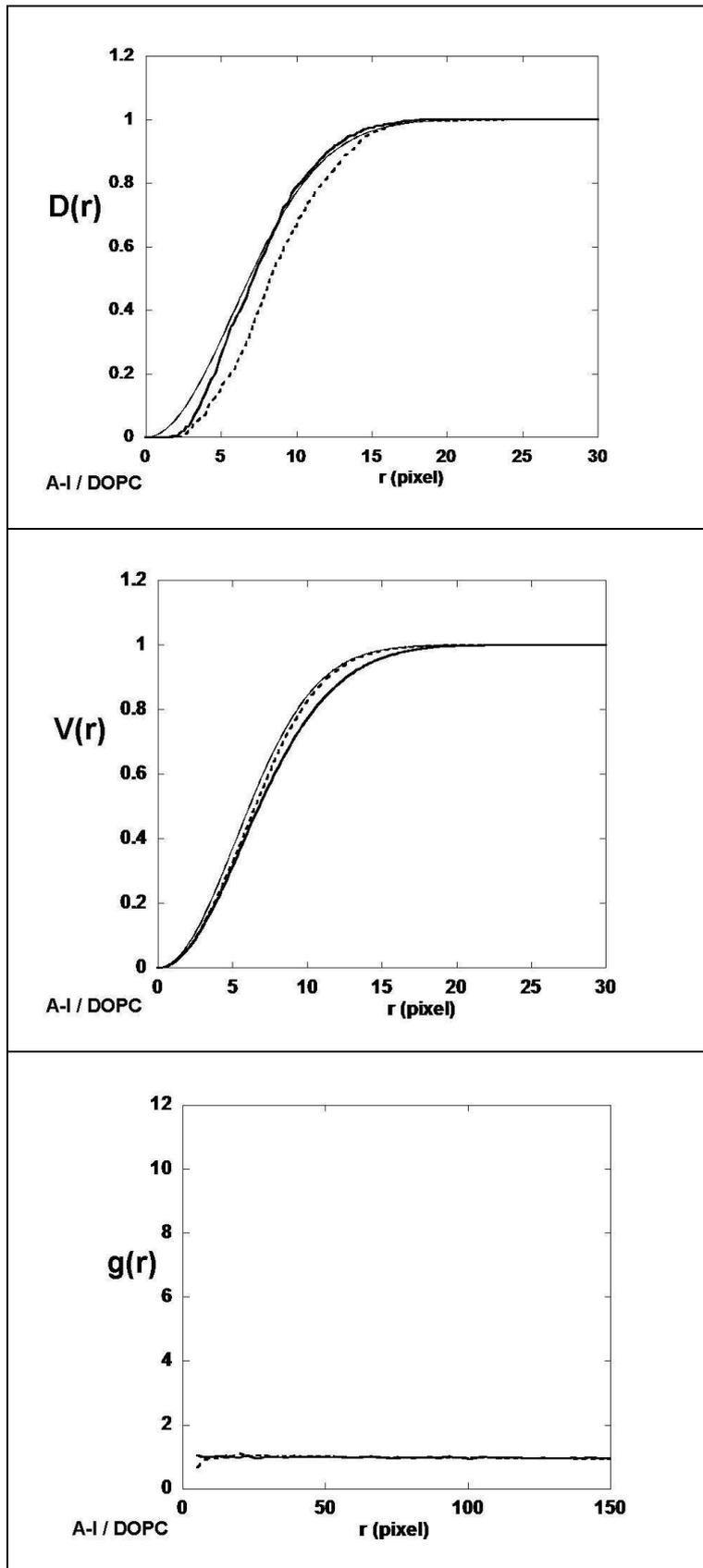


Figure 4 - Graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ pour l'image AFM de la couche mixte **Apo A-I / DOPC** (pression initiale 15 mN/m) montrée sur la figure 3. La simulation de points est en trait fin, celle de disques en trait épais et la distribution expérimentale en pointillé.

III. Distribution des particules formées par l'Apo A-I sur la couche mixte Apo A-I/DPPC

L'analyse de la distribution spatiale des particules protéiques est maintenant réalisée sur une couche mixte Apo A-I/DPPC, en présence de la coexistence des phases LE et LC (la pression initiale est de 15 mN/m). Nous avons dans un premier temps comparé la distribution expérimentale à une distribution de disques disposés aléatoirement sur l'image. Cette méthode a été utilisée pour confirmer une tendance non aléatoire dans la répartition des objets qui sont créés par la protéine, du fait de l'influence de la coexistence des phases. Ensuite, nous avons comparé la distribution de ces objets à l'intérieur des domaines LE à une distribution aléatoire de disques sur des zones représentant ces domaines. Ceci, afin de savoir si les particules protéiques sont distribuées aléatoirement dans cette phase, comme dans le cas de DOPC.

3.1 Etude de l'influence de la coexistence des phases

Nous avons caractérisé la distribution expérimentale des particules insérées dans la couche de DPPC, en prenant en compte les particules présentes dans les deux phases. Pour l'image présentée sur la figure 5, nous montrons sur la figure 6 deux types de distribution :

1°) La distribution expérimentale des particules sur l'image AFM. Les particules en phase LC furent sélectionnées en seillant l'image à une hauteur de 1.4 nm (NDG 140) au dessus du lipide et les particules en phase LE furent sélectionnées en seillant l'image à une hauteur de -0.3 nm (NDG 125) au dessous des domaines LC. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{Exp}$, $D(r)_{Exp}$ et $V(r)_{Exp}$.

2°) Une distribution simulée et aléatoire de disques « durs », de surface non nulle, sur une image de la taille de l'image AFM. La densité de disques correspond à la densité de particules sur l'image expérimentale en tenant compte des deux phases et la fonction statistique utilisée pour générer la taille des disques est la même que pour DOPC, puisque la distribution de la surface des disques ne subit ni l'influence de la charge, ni celle de la phase (voir chapitre 1 section 2.3). Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_H$, $D(r)_H$ et $V(r)_H$.

Cette distribution prend en compte 443 particules et des tests de reproductibilité ont été réalisés sur quatre autres images AFM (une partie de ces images sont montrées en annexe 4).

La figure 6 montre une différence nette entre la distribution expérimentale des particules et la distribution aléatoire des disques dans le cas de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$. $D(r)_{\text{exp}}$ croît plus vite avec r que $D(r)_{\text{H}}$, $V(r)_{\text{exp}}$ croît plus lentement avec r que $V(r)_{\text{H}}$ et pour finir $g(r)_{\text{exp}}$ est largement supérieur à $g(r)_{\text{H}}$ pour des distances inférieures à 40 pixels. Ces tendances montrent que les particules sont plus proches de leurs premières voisines et que les vides sont plus grands que dans le cas d'une distribution aléatoire. Ceci prouve que contrairement à la distribution des objets sur DOPC, cette répartition là n'est pas aléatoire, mais regroupée. Nous en déduisons que la densité plus forte de particules dans les domaines LE que dans les zones LC, qui fut montrée au chapitre 3 section 2.3.2, résulte bien d'une différence d'insertion en fonction de la phase et ne peut pas s'expliquer par une distribution aléatoire des particules sur l'image. Cependant, nous avons considéré ici les objets en phase LE sans rejeter ceux pouvant être des îlots de lipides en phase condensée. Afin de s'assurer que l'effet de regroupement vu sur la distribution expérimentale n'est pas lié à la présence de ces domaines lipidiques, les calculs ont été refaits en ne considérant que les objets au dessus de la hauteur de -0.35 nm (voir chapitre 3 section 2.3.2). Ces résultats confirment l'influence de la coexistence des phases et sont montrés dans l'annexe 6.

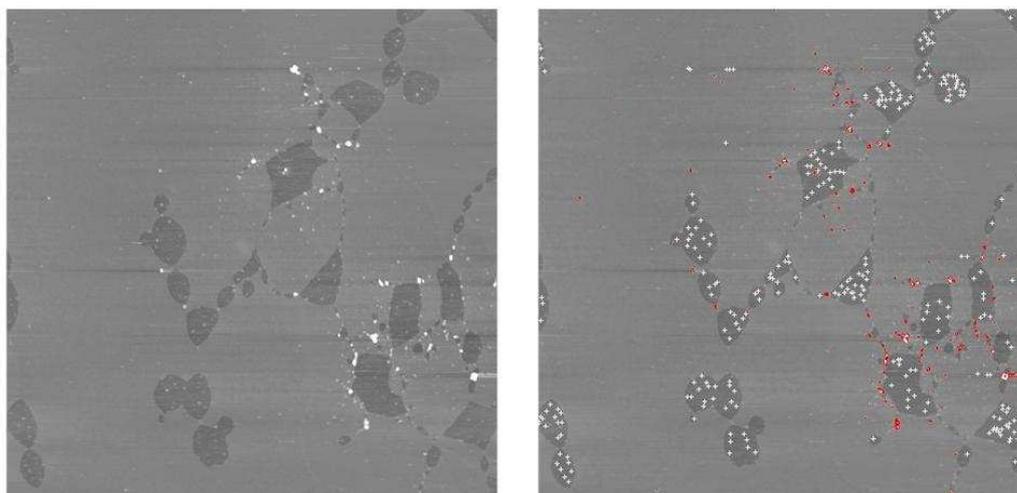


Figure 5 - A gauche : image AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) du prélèvement d'une couche mixte Apo A-I / DPPC, pour une pression avant injection de 15 mN/m. A droite : sur la même image, les objets sélectionnés sont marqués en rouge dans la phase LC et en blanc dans la phase LE.

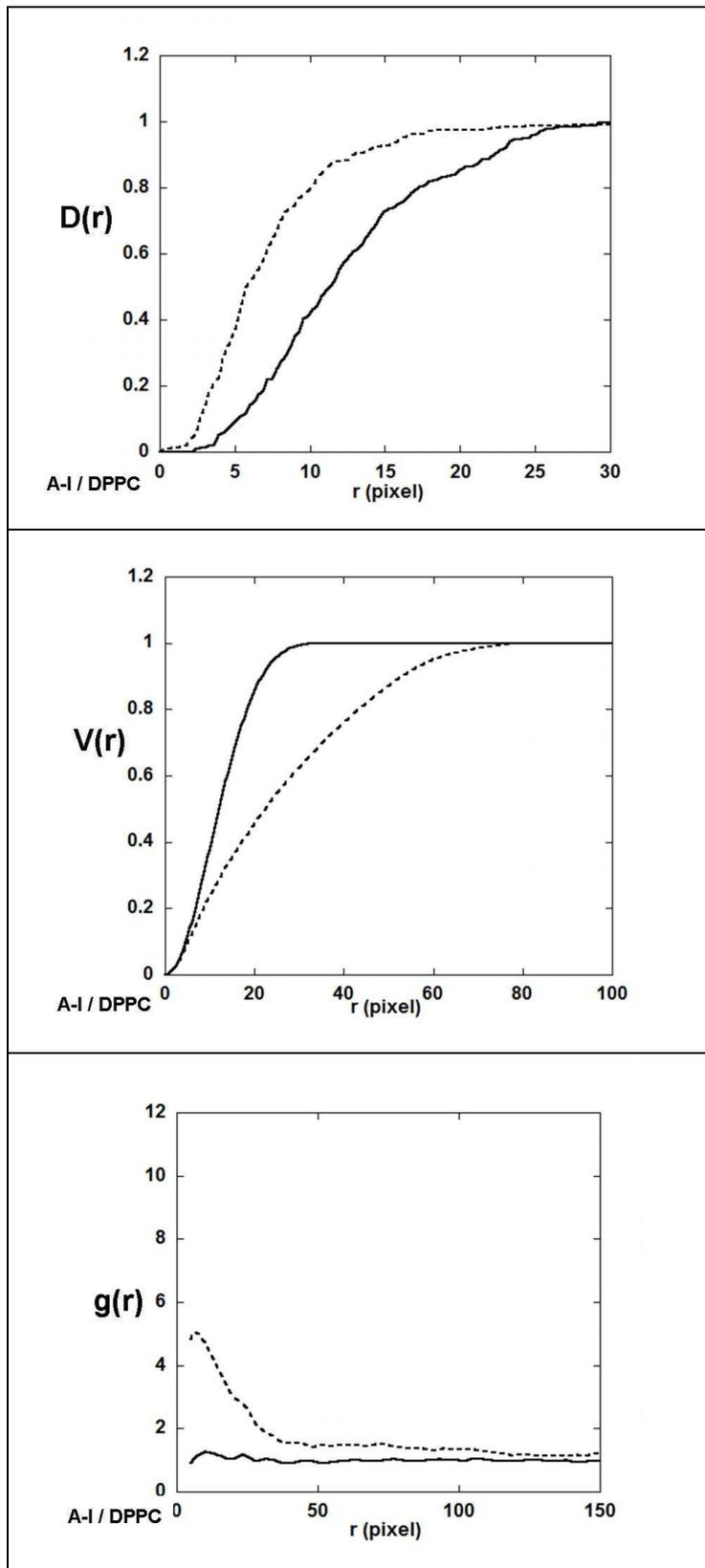


Figure 6 - Graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ pour l'image AFM de la couche mixte Apo A-I/DPPC (pression initiale de 15 mN/m) montrée sur la figure 5. La distribution de disques est en trait épais et la distribution expérimentale en pointillé.

3.2 Analyse de la distribution des particules à l'intérieur des domaines LE

Nous venons de montrer que la coexistence des phases modifie la distribution des particules protéiques sur une couche de DPPC, ce qui se traduit par une densité d'objets plus forte dans les zones LE que dans les zones LC. Nous voulons maintenant savoir si ces objets sont distribués à l'intérieur des domaines LE de manière aléatoire, ou si il existe des interactions entre eux, notamment dans le cas où le regroupement provoqué par la coexistence des phases augmenterait les interactions stériques entre ces objets. Pour la même image AFM que celle utilisée dans l'étude précédente (figure 5), nous montrons sur la figure 7 trois distributions différentes :

1°) La distribution expérimentale des particules à l'intérieur des zones LE de l'image AFM. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{Exp}$, $D(r)_{Exp}$ et $V(r)_{Exp}$.

2°) La distribution simulée de points (selon une loi de Poisson), de surface nulle, dans des zones circulaires⁴ dont la position et la surface correspondent à celles des zones LE de l'image AFM. La densité de points dans ces zones circulaires correspond à la densité d'objets dans la phase LE de l'image expérimentale. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{P-LE}$, $D(r)_{P-LE}$ et $V(r)_{P-LE}$.

3°) La distribution simulée et aléatoire de disques « durs », de surface non nulle, à l'intérieur des zones circulaires représentant les domaines LE. La densité de disques dans ces zones circulaires correspond aussi à la densité d'objets dans la phase LE de l'image expérimentale. Les surfaces des disques sont toujours générées selon la même loi statistique. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{H-LE}$, $D(r)_{H-LE}$ et $V(r)_{H-LE}$.

Cette distribution prend en compte 296 particules et des tests de reproductibilité ont été réalisés sur quatre autres images AFM (une partie de ces images sont montrées en annexe 4).

⁴ Lorsque les zones LE des images AFM de DPPC ne sont pas tout à fait circulaires, nous reconstruisons ces zones par une succession de cercles côte à côte.

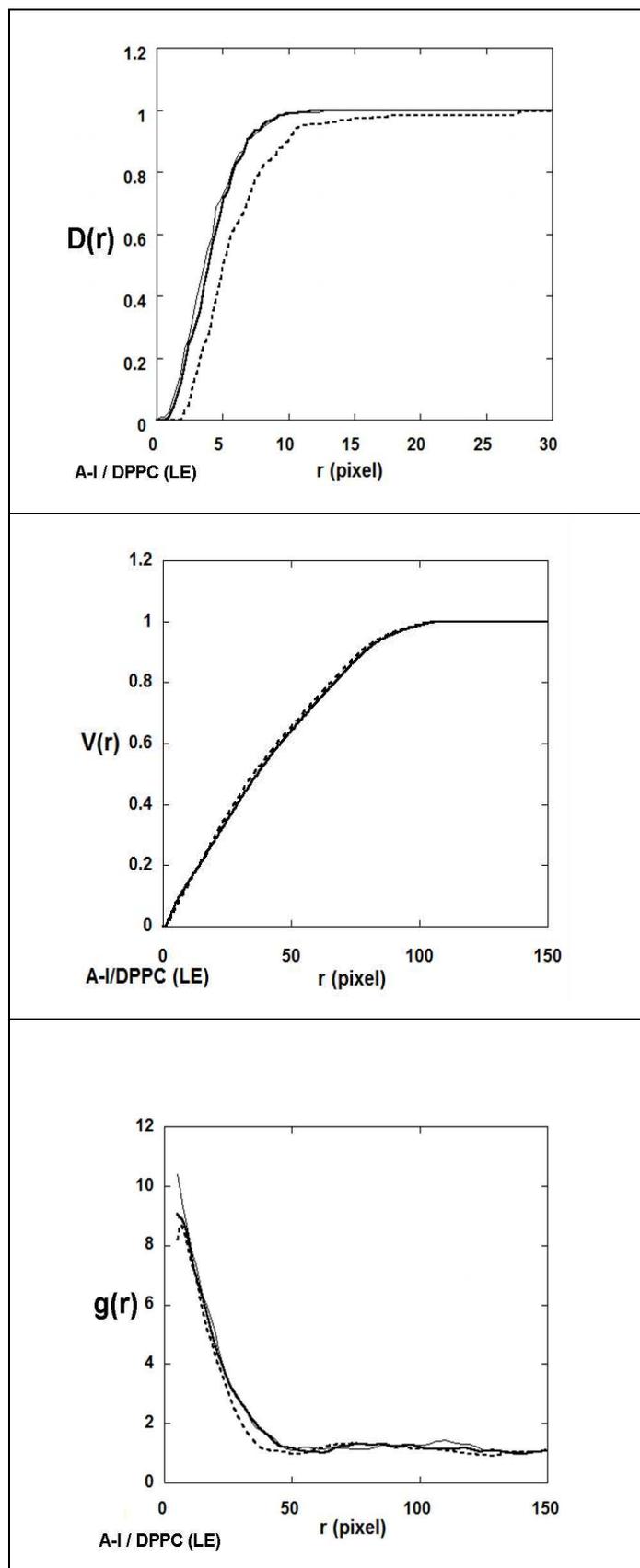


Figure 7 - Graphes de $D(r)$ (A), $V(r)$ (B) et $g(r)$ (C) pour l'image AFM de la couche mixte Apo A-I/DPPC (pression initiale de 15 mN/m) montrée sur la figure 5. Les distributions des objets à l'intérieur des domaines circulaires sont en trait fin pour les points et en trait épais pour les disques. La distribution expérimentale dans la phase LE est en pointillé.

Nous constatons un très bon accord entre les trois distributions. Premièrement, ceci indique, comme dans le cas de DOPC, qu'il n'existe pas d'interactions à longues portées entre les particules créées par la protéine, puisque $g(r)_{Exp}$ décroît à la même vitesse que les deux autres $g(r)$. Deuxièmement, la proximité des trois $D(r)$ et des trois $V(r)$ indique que l'influence des interactions stériques sur l'organisation spatiale des particules formées par l'Apo A-I ne s'est pas accentuée sous l'effet du regroupement, par rapport à DOPC. Nous constatons un décalage entre $D(r)_{Exp}$ et les autres $D(r)$, comme pour le cas de DOPC, qui est peut-être provoqué par la sous-estimation de la surface des objets. La différence observée sur DPPC ne semble pas plus importante que celle qui est visible sur DOPC, ce qui confirme la similarité de la distribution des surfaces des objets dans la phase LE des deux lipides. Pour finir, nous avons considéré ici l'ensemble des particules seuillées présentes dans la phase LE quelque soit leur hauteur, et même si celles-ci pouvaient correspondre à des domaines lipidiques en phase LC. L'absence d'interactions entre ces objets indiquent que les particules protéiques ne sont pas attirées par les domaines LC ni par leur interface avec la phase LE. **Ceci est donc une confirmation de l'affinité plus importante de la protéine pour la phase LE à l'échelle micrométrique.**

L'analyse de la distribution des particules sur les domaines LC uniquement, ne nous a pas paru intéressante dans la mesure où le nombre d'objets présents dans cette phase est faible et ne permet pas une bonne analyse statistique.

IV. Distribution des particules formées par l'Apo A-I sur la couche mixte Apo A-I/DPPG

La dernière partie de cette analyse statistique, concernant la distribution spatiale des particules formées par l'Apo A-I dans les couches de lipides, porte sur la caractérisation de la couche Apo A-I/DPPG, avec une pression avant injection de 15mN/m. Après un simple examen à l'œil, il semble que la différence d'affinité de la protéine entre les deux phases, si elle existe, est nettement moins forte que dans le cas de DPPC. La caractérisation de la distribution des particules dans les deux phases et la comparaison avec les répartitions vues sur DOPC et DPPC, nous permettra par la suite d'estimer avec plus de précision l'influence de cette phase.

Déterminer l'influence de la phase sur la présence des particules protéiques est moins évident sur une couche de DPPG que sur une couche de DPPC. Comme il a été expliqué précédemment les domaines LE sont souvent larges sur les prélèvements observés et peuvent parfois se confondre avec la phase LC. La correction systématique des hauteurs produite par le microscope AFM place les lipides de la phase LE à des hauteurs variables. Nous avons donc adapté le seuillage en fonction de chaque image, de manière en prendre en compte le maximum de particules dans les deux phases. Pour l'image présentée sur la figure 8, nous montrons sur la figure 9 deux types de distribution :

1°) La distribution expérimentale des particules sur l'image AFM. La position des particules est déterminée à partir d'un seuil relatif à l'image choisie. Pour l'image montrée ici la hauteur du seuillage est de 0.6 nm au dessus du lipide (NDG 133 pour les deux phases). Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{Exp}$, $D(r)_{Exp}$ et $V(r)_{Exp}$.

2°) Une distribution simulée et aléatoire de disques « durs », de surface non nulle, sur une image de la taille de l'image AFM. La densité de disques correspond à la densité de particules sur l'image expérimentale en tenant compte des deux phases et la fonction statistique utilisée pour générer la taille des disques est la même que pour les deux autres lipides. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_H$, $D(r)_H$ et $V(r)_H$.

Cette distribution prend en compte 714 particules et des tests de reproductibilité ont été réalisés sur trois autres images AFM (ces images sont montrées en annexe 4).

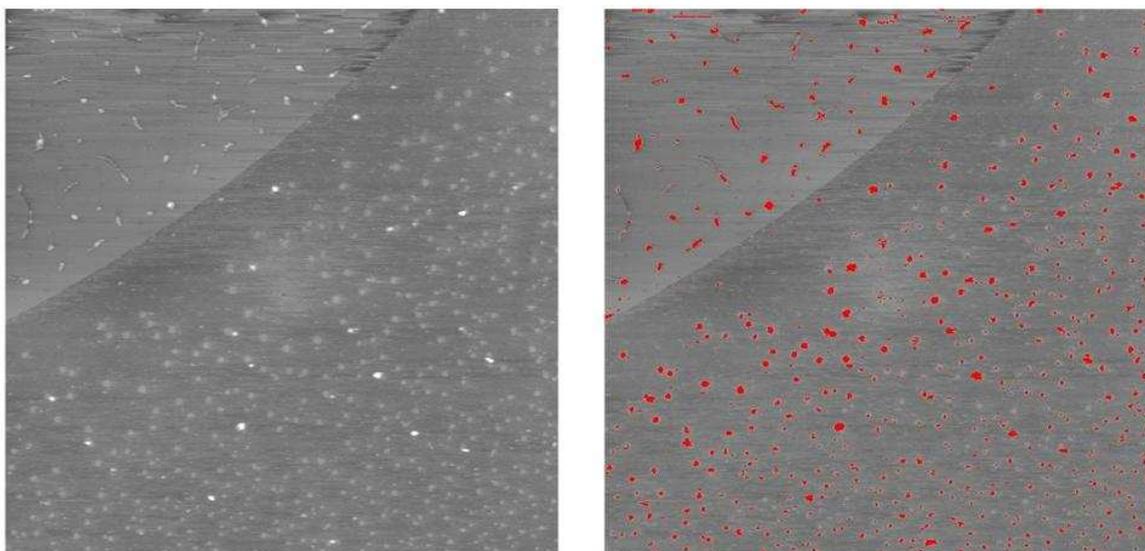


Figure 8 - A gauche, une image AFM ($8 \times 8 \mu m^2$) du prélèvement de la couche mixte Apo A-I/DPPG (pression initiale de 15 mN/m) sur laquelle a été effectuée l'analyse de la distribution spatiale présentée sur la figure 9. A droite, sur la même image, les objets sélectionnés sont marqués en rouge.

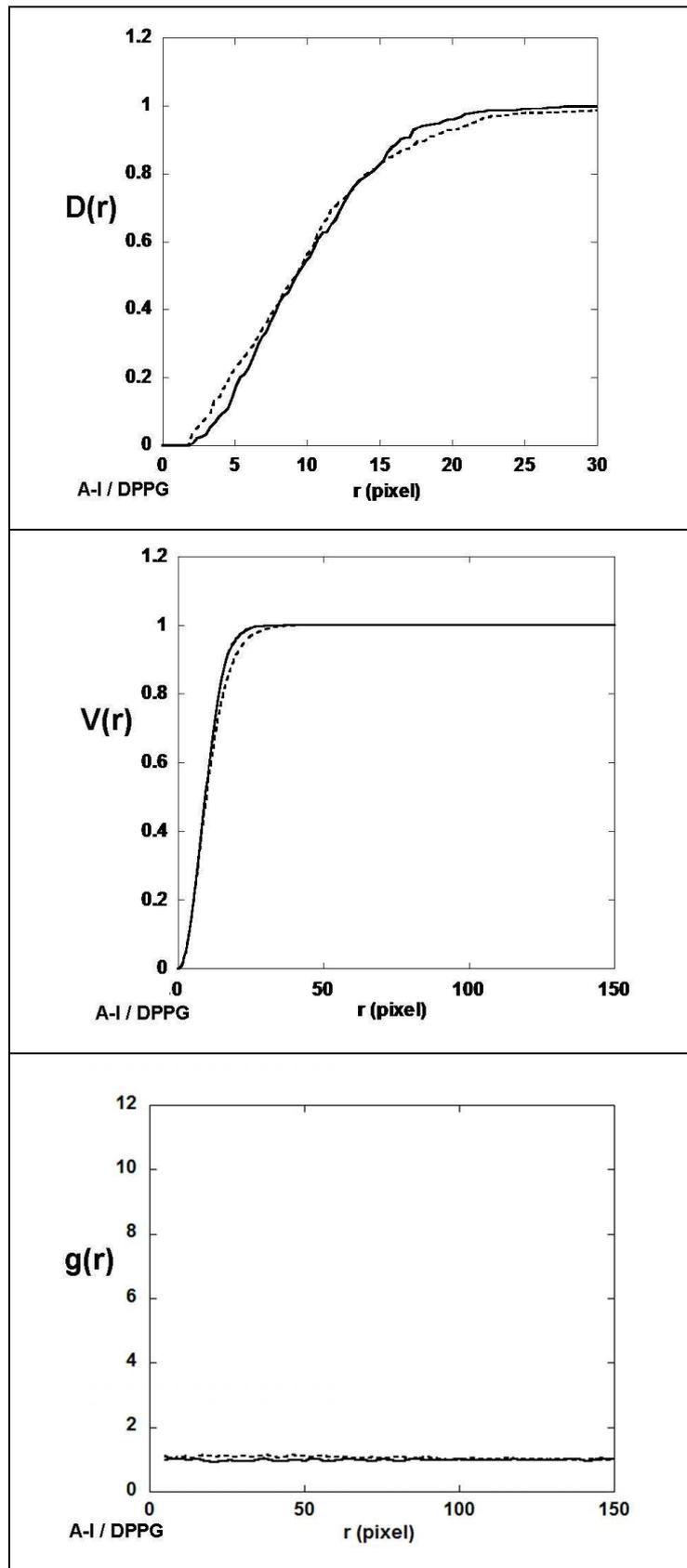


Figure 9 - Graphes de $D(r)$ (A), $V(r)$ (B) et $g(r)$ (C) pour l'image AFM de la couche mixte Apo A-I/DPPG (pression initiale de 15 mN/m) montrée sur la figure 8. La distribution de disques est en trait épais et la distribution expérimentale en pointillé.

La proximité entre les $g(r)$ des distributions expérimentale et aléatoire montre clairement l'absence d'interactions à longue distance entre les particules protéiques. La proximité entre disques et particules pour les courbes de $D(r)$ et $V(r)$ montre également que seules des interactions stériques peuvent avoir lieu entre ces objets. Nous ne retrouvons pas sur $D(r)$, le décalage entre la simulation de disques et la distribution expérimentale observée sur les autres lipides. Ceci peut-être due au fait que la quantité de particules sélectionnées sur cette couche est plus faible que dans la phase LE des deux autres lipides. Nous constatons ainsi, que la répartition des objets sur une couche de DPPG est très proche de la répartition vue sur la couche de DOPC et très différente de celle trouvée sur la couche de DPPC. Ceci montre que l'influence de la coexistence des phases sur le positionnement des objets créés par la protéine dans une couche de DPPG est négligeable, comparativement à l'influence qu'elle exerce dans le lipide zwitterionique DPPC.

Cependant la quantité de particules présentes dans cette phase a pu être sous-estimée (seuillage à une hauteur trop élevée) ou surestimée (prise en compte de domaines lipidiques), puisque celle-ci dépend du seuillage utilisé. Une sous-estimation serait en accord avec le fait que la quantité de particules sélectionnées soit plus faible pour DPPG que pour DOPC lorsque la pression avant injection est de 15 mN/m, alors que la surpression est plus forte. Cependant, un examen à l'œil de cette image nous montre qu'une sous estimation pouvant expliquer une différence significative n'est pas possible. S'il est plus difficile d'estimer le nombre de particules qui pourraient être impliquées dans une surestimation des objets insérés en phase LE, cet effet ne peut avoir pour incidence que d'augmenter la différence entre DPPC et DPPG en ce qui concerne l'influence de la phase. Nous verrions à ce moment là une influence opposée de la distribution des phases, avec une insertion plus forte en phase LC, pour DPPG.

Conclusion / Discussion du chapitre 4

Nous avons montré au chapitre précédent que la protéine s'insérait dans les couches de DPPC, DOPC et DPPG, en créant des objets de taille nanométrique visibles par microscopie AFM. Au cours de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la répartition spatiale de ces objets sur les couches de lipides. Cette distribution fut caractérisée au moyen de trois fonctions : la fonction de corrélation $g(r)$ qui représente la variation locale de la densité des particules par rapport à leur densité moyenne sur l'image, la fonction $D(r)$ qui sonde les distances entre premiers voisins et la fonction $V(r)$ qui fournit une information sur la taille occupée par les vides. Nous avons ensuite comparé cette distribution expérimentale à des distributions aléatoires de disques durs et de points.

Nos résultats montrent l'absence d'interactions à longues distances entre ces particules dans la couche de lipides et ceci pour les trois phospholipides utilisés. Nous observons ainsi une répartition aléatoire des particules formées par la protéine sur la couche de DOPC. En revanche, dans le cas d'une couche de DPPC, la répartition des objets est très différente de celle obtenue par un positionnement aléatoire sur la couche et montre un regroupement. La forte différence dans la densité d'objets entre la phase LE et la phase LC, observée dans le chapitre précédent, indique que c'est la distribution des phases qui influence la répartition des particules formées par la protéine. Quand nous analysons cette répartition à l'intérieur des zones LE, nous retrouvons un comportement aléatoire, indiquant que les particules protéiques n'ont pas d'affinité particulière pour les domaines LC de petites surfaces, ni pour leur interface avec la phase LE. Ainsi, les particules créées par la protéine à l'intérieur des domaines LE de DPPC ont un comportement identique à celui qui est visible sur une couche de DOPC. Ceci met en évidence que la plus grande affinité de l'Apo A-I pour la phase expansée par rapport à la phase condensée existe toujours lors d'une coexistence de phases, impliquant des domaines de tailles micrométriques et sub-micrométriques, et que le comportement des particules produites par la protéine est similaire quelque soit la taille du domaine.

La distribution des objets dans DPPG est plus proche de celle observée dans DOPC que de celle observée dans DPPC. Ceci indique que la plus forte affinité de la protéine pour la phase LE que pour la phase LC, observée dans DPPC, est négligeable ou même inversée dans DPPG. Nos résultats révèlent la présence d'une interaction électrostatique forte entre l'Apo A-I et DPPG qui domine l'influence entropique responsable de la différence d'affinité

de la protéine entre les phases. Nous confirmons ainsi les résultats du chapitre précédent, où nous pouvions constater que la différence entre les pressions d'exclusion π_e est plus forte entre DPPG et DPPC, qu'entre DOPC et DPPC.

Ainsi, les résultats obtenus dans ce chapitre et au chapitre précédent nous permettent de faire deux constations :

Première constatation : au chapitre précédent nous avons montré une forte similarité dans la distribution des surfaces des particules protéiques d'un lipide à l'autre. Ainsi, si les particules protéiques occupent une surface totale plus importante dans un lipide que dans un autre, ceci est seulement lié à un nombre de particules plus important dans ce lipide (et non à une différence dans la coopérativité des protéines). Nous en déduisons que l'affinité de l'Apo A-I pour la phase ou la charge d'un lipide est directement reliée au nombre de particules qui sont présentes sur la couche. De plus, les résultats exposés dans ce chapitre montrent que ces différences d'affinité existent toujours sur des zones de taille micrométrique. Toujours au chapitre précédent, nous avons vu un modèle d'auto-association en deux étapes où dans un premier temps, une protéine s'insère dans la couche de lipides pour former un noyau. **L'affinité de l'Apo A-I pour une zone lipidique est donc directement révélée par la quantité de noyaux qui se sont formés sur cette zone.**

Deuxième constatation : Nous venons de montrer au cours de ce chapitre que ces particules ne créent pas entre elles d'interactions attractives ou répulsives susceptibles de favoriser ou défavoriser la formation d'autres particules autour d'elles. **Ainsi, l'insertion d'une protéine dans la couche de lipides pour former un noyau est complètement indépendante de la présence de particules autour d'elle.**

Nous en concluons que les différences d'affinité entre les phases et les charges du lipide, observées à l'échelle macroscopique par ellipsométrie, tensiométrie et à l'échelle microscopique grâce au microscope AFM existent également à l'échelle du noyau, donc de la molécule unique. Nous en concluons également que l'influence de la charge domine l'influence de la phase à cette échelle.

Bibliographie du chapitre 4

1. *Stoyan, D., W. S. Kendall, and J. Mecke. 1995. Stochastic Geometry and its applications, Second Edition. Wiley, New-York.*
2. *Baddeley, A., and R. D. Gill. 1997. Kaplan-Meier estimators of distance distributions for spatial point processes. Annals of Statistics 25:263-292.*
3. *Kerscher, M. 1998. Regularity in the distribution of superclusters? A&A 336:29-34.*
4. *Fiksel, T. 1988 Edge-corrected density estimators for point processes Statistics 19:67 - 75.*
5. *Stoyan, D., and H. D. Schnabel. 1990. Description of relations between spatial variability of microstructure and mechanical strength of alumina ceramics. Cermics International 16:11-18.*
6. *Stoyan, D., U. Bertram, and H. Wendrock. 1993. Estimation variances for estimators of product densities and pair correlation functions of planar point processes Ann. Inst. Statist. Math. 45:211-221.*
7. *Kerscher, M. 1999. The geometry of second-order statistics-biases in common estimators of the galaxy correlation function A&A 343:333-347.*
8. *Pons-Borderia, M. J., V. J. Martinez, D. Stoyan, and H. Stoyan. 1999. Comparing Estimators of the Galaxy Correlation Function. Ap. J.:480-491.*
9. *Stoyan, D., and H. Stoyan. 2000. Improving Ratio Estimators of Second Order Point Process Characteristics. Scandinavian Journal of Statistics 27:641-656.*
10. *Hanisch, K. H. 1984. Some remarks on estimators of the distribution function of nearest neighbour distance in stationary spatial point patterns. Statistics 15:409-412.*
11. *Ripley, B. D. 1981. Spatial Statistics Wiley, New-York Chapitre 3.*

CHAPITRE 5

Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines

I. Comparaison de l'Apo A-I à des fragments de la dystrophine

L'objectif de cette étude réside en deux points. Premièrement nous avons testé les outils d'analyse statistique, développés pour l'étude de l'Apo A-I, sur des fragments d'une protéine à motifs répétés nommée dystrophine. Ces fragments possèdent des propriétés interfaciales particulières. Nous avons de cette façon voulu savoir si la nature de certains comportement (comme l'insertion des protéines dans la couche lipidique ou leurs interactions en sous-phase avec les têtes polaires) pouvaient avoir une incidence sur la forme des particules protéiques visibles à l'AFM. Nous montrons ainsi que l'analyse statistique de la forme des particules créées sur la couche de lipides par les protéines peut, en parallèle de la mesure de la surface d'occupation, indiquer si les interactions entre les protéines et les lipides sont électrostatiques ou plutôt liées à l'amphiphilicité de la protéine. Deuxièmement, nous avons comparé les formes des particules présentes sur les nouvelles couches protéines/lipides, aux formes de celles qui sont présentes sur les couches Apo A-I/lipides, afin de caractériser l'interaction de l'Apo A-I avec les lipides en fonction du modèle d'interaction obtenu par l'étude des fragments de la dystrophine.

1.1. Présentation de la dystrophine et de ses fragments : R20-24, R1-3 et R2

La dystrophine est une protéine filamenteuse de grande taille (3685 résidus) qui se trouve dans les cellules nerveuses et musculaires, où elle est localisée sur la face interne de la membrane cellulaire. La dystrophine fait partie d'un large complexe de glycoprotéines, qui permet de stabiliser la membrane cellulaire lors de stress répétitifs liés à des contractions musculaires. Cette protéine constitue un filament interagissant à la fois avec l'actine du cytosquelette et la membrane plasmique. Son absence, due à une mutation génétique, provoque la rupture de la membrane cellulaire, ce qui conduit à un processus physiopathologique majeur des dystrophies musculaires (notamment dans la myopathie de Duchenne) (1).

La structure de la dystrophine est globalement constituée de quatre domaines délimités de la manière suivante, lorsque l'on se déplace de la partie N-terminal vers la partie C-terminal (1) (voir figure 1) :

- la partie N-terminal, qui interagit avec les filaments d'actine.
- un large domaine situé au centre de la protéine et nommé « Rod-Domain ».
- deux domaines qui interagissent avec le complexe glycoprotéique, donc avec la membrane cellulaire : le domaine CR (riche en cystéine) situé près de la partie C-terminal et la partie C-terminal, elle-même.

Le domaine central de la protéine est constitué de 24 répétitions homologues d'environ 110 résidus chacune, qui sont structurées en trois hélices α dans un arrangement compact et antiparallèle (« coiled-coil »), qui ressemble au motif de la spectrine. Nous pouvons diviser ce « Rod domain » en trois sous-domaines, séparés par des zones flexibles (« hinges ») qui sont (2, 3) : **le sous-domaine R1-3** (constitué de 3 répétitions, qui comme son nom l'indique vont de la première à la troisième), **le sous-domaine R4-19** (constitués de 16 répétitions) et **le sous-domaine R20-24** (constitués de 5 répétitions) (1) (voir figure 1).

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

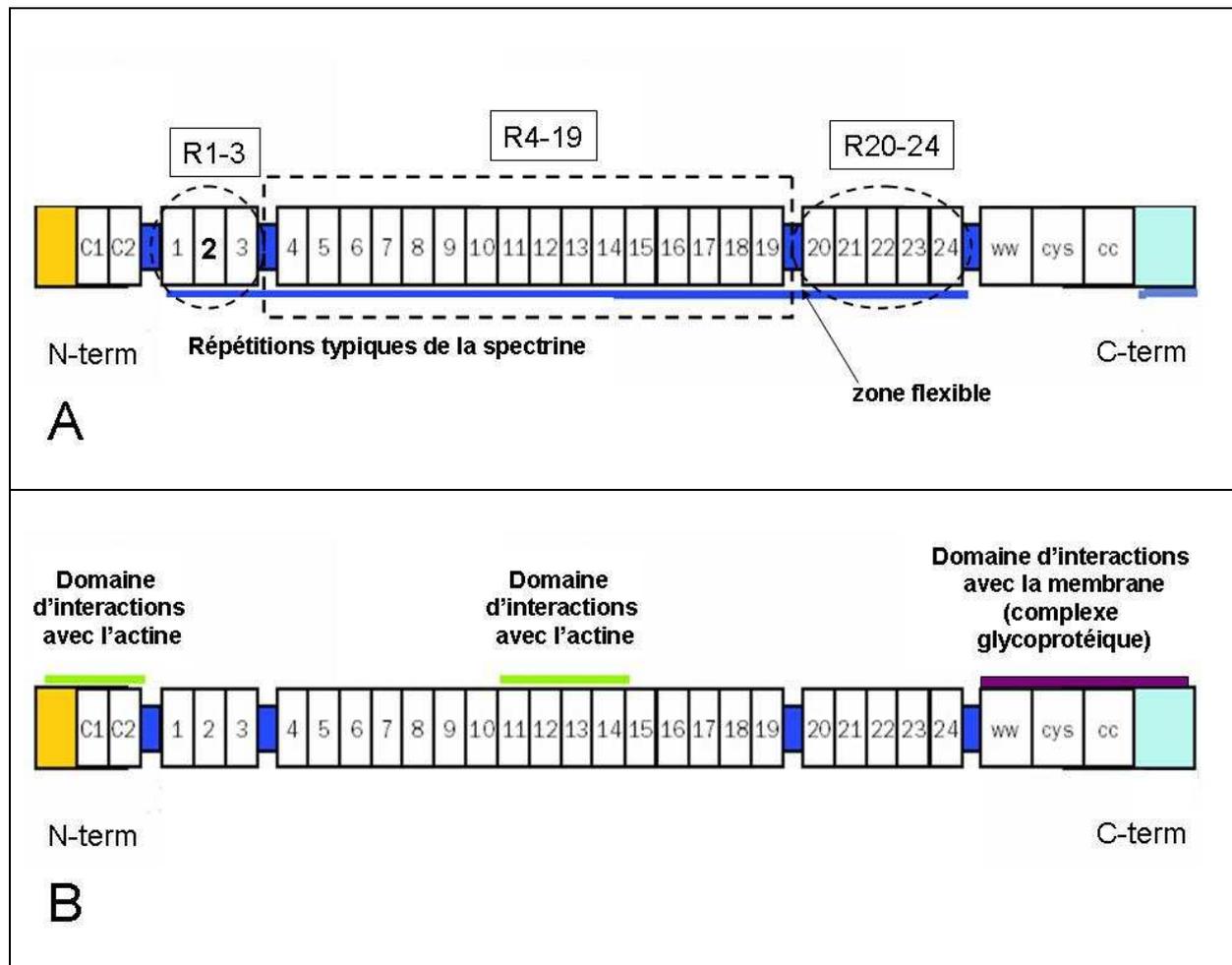


Figure 1 – Séquence de la dystrophine : le « Rod-Domain » est composé de 24 répétitions d'un motif analogue à celui de la spectrine. Sur la figure A, nous voyons en pointillé la délimitation des sous-domaines, ceux-ci sont séparés par des zones flexibles (« hinges »). Les répétitions du motif sont soulignées en bleu, et la répétition R2 est indiquée en caractères gras, au milieu du sous-domaine R1-3. Sur la figure B, les sites d'interactions avec l'actine et avec le feuillet interne de la membrane sont localisés.

Les fonctions du domaine central restent encore mal connues, même si un site d'interactions avec l'actine a déjà été identifié au centre de celui-ci (4). Cependant des études *in vitro*, réalisées par la mesure de la fluorescence du tryptophane, ont mis en évidence que certaines parties spécifiques localisées sur ce domaine pouvaient interagir directement avec les lipides zwitterioniques et/ou anioniques (5-7). Ainsi, ces études ont montré que la deuxième répétition présente sur ce domaine, R2 (125 acides aminés), interagit avec les lipides. Elles ont également montré l'interaction avec les lipides lorsque l'ensemble du sous-domaine R1-3, auquel appartient R2, est considéré. Nous rappelons que ce sous-domaine est

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

situé à proximité de l'extrémité N-terminal, qui elle, se lie à l'actine. Ces travaux ont aussi révélé que le sous-domaine R20-24 crée peu d'interactions avec les lipides, alors qu'il est situé à proximité de la partie C-terminal qui elle interagit avec la membrane cellulaire (8). Les études évoquées mirent également en évidence l'implication d'interactions électrostatiques entre protéines et lipides ainsi que l'implication de l'amphiphilicité des protéines, lorsque les protéines s'accrochent à la couche lipidique. Ces interactions n'ont pas encore été démontrées dans l'environnement cellulaire, mais pourraient constituer un point clé de la résistance des cellules musculaires au stress provoqué par les cycles de « contraction - relaxation » exercés sur les membranes cellulaires.

D'autres travaux menés par Véronique Vié et Elisabeth Le Rumeur ont eu pour objectif d'étudier l'interaction de R2, R1-3 et R20-24 (que nous qualifierons par la suite de protéines ou de fragments de la dystrophine) avec les phospholipides par des expériences sur cuve de Langmuir (9). Dans ce cas là, les fragments du « Rod Domain » interagissent avec une monocouche de phospholipides déposée à l'interface liquide/air, cette monocouche modélisant le feuillet interne de la membrane cellulaire. Ces études ont été complétées par spectroscopie PM-IRRAS et microscopie AFM. Chaque fragment a été injecté dans une sous-phase de tampon [10 mM Tris (pH 7.5) + 150 mM NaCl + 1mM EDTA] à une concentration de 0.166 μ M. A cette concentration l'interface liquide/air n'est pas saturée et l'interaction protéine - lipides est donc privilégiée devant l'interaction entre protéines en sous-phase (voir chapitre 2 section 3.1).

Je me suis personnellement impliqué dans l'étude de l'organisation des protéines sur les couches mixtes protéines/phospholipides, à partir des images AFM réalisées sur des prélèvements de Langmuir-Blodgett. Ce travail a permis d'une part de quantifier les informations obtenues par microscopie AFM et d'autre part de tester les outils de traitement d'images, développés au cours de l'étude sur l'Apo A-I, sur des protéines dont les propriétés physicochimiques diffèrent de celles de l'Apo A-I.

1.2. La surface d'occupation et la relation entre hauteur et surface des particules fournissent une information sur la nature de l'interaction

1.2.1 Principe de l'étude

Des études précédentes ont montré que R2 et R1-3 interagissent avec des vésicules de DOPC/DOPS (2 :1) contrairement à R20-24 (8). Elles ont également montré qu'aucun de ces fragments n'interagit avec les vésicules de DOPC/DOPE (2:1). Le travail présenté ici est associé à une étude portant sur la caractérisation de l'interaction entre ces fragments et un lipide anionique, DOPS. La composition des couches lipidiques est principalement un mélange (DOPC/DOPS) en proportion (1:1). Des expériences supplémentaires ont également été réalisées par les auteurs de cette étude sur des couches pures de DOPC et DOPS, afin de confirmer l'implication de la charge électrostatique du lipide anionique dans l'interaction entre les fragments de la dystrophine et les lipides. Chaque expérience fut répétée au moins trois fois. L'analyse des images AFM avait pour objectif de caractériser l'interaction des protéines avec la couche de lipides selon deux critères : la surface totale occupée par les particules protéiques dans la couche, ce qui donne une information sur l'affinité de la protéine pour le lipide, et la hauteur des particules, ce qui donne une information sur le volume de protéines à l'extérieur de la couche lipidique.

Les couches lipidiques étant entièrement en phase LE, nous avons utilisé un seul seuillage sur ces images, à une hauteur de 0.3 nm au dessus du lipide (NDG 135). Ainsi, le tableau 1 montre, pour les différentes couches mixtes et pour des pressions avant injection de 20 mN/m et 30 mN/m, la quantité de particules créées par ces protéines et les surfaces totales occupées par celles-ci, qui ont été mesurées sur les images AFM (5*5 μm^2) exposées sur les figures 2 et 3. Dans le cas de R20-24, nous constatons que le nombre de particules varie plus fortement que la surface totale qu'elles occupent, quand on augmente la pression initiale de la couche de lipides. Cette observation nous a motivé à considérer en même temps le nombre de particules et la surface totale qu'elles occupent, à l'interface liquide/lipides.

Pour caractériser la tendance des protéines à interagir en sous phase ou à s'insérer dans la couche lipidique, nous avons observé les hauteurs des particules en fonction de leur surface, pour différentes compacités de la couche de lipides (les pressions avant injection sont

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

de 20 mN/m et 30 mN/m). Ainsi, avec les mêmes images et pour chaque fragment, nous avons réalisé un graphe montrant la hauteur de chaque particule en fonction de sa surface, pour les deux pressions initiales (voir figure 4).

Comme l'acquisition des images AFM fut effectuée avant que ce projet d'analyse statistique soit considéré, ces images n'ont pas été réalisées en même quantité que pour l'étude de l'Apo A-I. Ainsi, nos mesures ont été obtenues sur une à trois images AFM. Cependant, les différences importantes entre les différentes couches, sur le pourcentage de surface occupée par les particules protéiques et sur le nombre de particules par image, permettent d'extraire une tendance, sans avoir besoin de réaliser une étude statistique sur un grand nombre d'images. De même, l'influence de la résolution latérale de l'image AFM sur la mesure de la surface occupée par les particules protéiques a déjà été étudiée avec l'Apo A-I (voir annexe 5). Or, pour les fragments de la dystrophine, la surface d'occupation varie fortement lorsque l'on modifie la composition de la couche. Nous estimons donc que l'influence de la résolution n'affecte pas les tendances que nous mettons en évidence.

Pour la pression initiale de 30 mN/m, chaque graphe a été effectué à partir d'au moins 1473 particules et deux images AFM. Pour la pression initiale de 20 mN/m, chaque graphe a été effectué à partir d'une ou deux images AFM et sur au moins 221 particules. Ceci nous semble suffisant pour déterminer les tendances dans les changements de forme des particules créées par les protéines.

1.2.2 Résultats sur R20-24

La surface occupée par les particules formées par ce fragment dans le mélange DOPS/DOPC (1 :1) avec une pression avant injection de 20 mN/m représente 0.5 % de la surface de la couche, pour un total de 120 particules en moyenne par image. Quand la pression initiale passe à 30 mN/m, la surface occupée par les particules protéiques augmente d'un facteur 4 et le nombre de particules d'un facteur 10, par rapport aux mesures réalisées précédemment.

Nous constatons de plus que la hauteur de ces objets augmente significativement lorsque la pression avant injection passe de 20 mN/m à 30 mN/m. Ainsi, pour une même surface, les particules atteignent en moyenne une hauteur deux fois plus importante.

Nous constatons donc, que lorsque la pression initiale du lipide est la plus forte, la quantité de protéines en interaction est plus grande et les hauteurs des particules deux fois

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

plus élevées que sur la couche dont la pression initiale est la plus faible. L'élévation de la pression initiale de la couche de DOPS/DOPC a pour effet de rapprocher les têtes polaires des lipides et d'augmenter la densité de charges négatives présentes à la surface. Nous en concluons que R20-24 n'interagit que faiblement avec la couche la moins compacte, le faible taux d'occupation montre que l'amphiphilicité de cette protéine ne lui permet pas d'être fortement présente dans la couche lipidique à cette pression. Mais lorsque la compacité de la couche augmente, l'interaction électrostatique de R20-24 avec les têtes polaires augmente et ce fragment interagit alors plus fortement avec la couche lipidique, en se plaçant à la hauteur des têtes polaires. Entre ces deux prélèvements, le nombre de particules varie d'un facteur 10 tandis que la surface occupée ne varie que d'un facteur 4. Ceci indique que le périmètre des particules protéiques augmente lorsque l'interaction entre R20-24 et la couche lipidique devient moins favorable. Les interactions protéine - protéine permettent ainsi de stabiliser R20-24 à proximité de la couche.

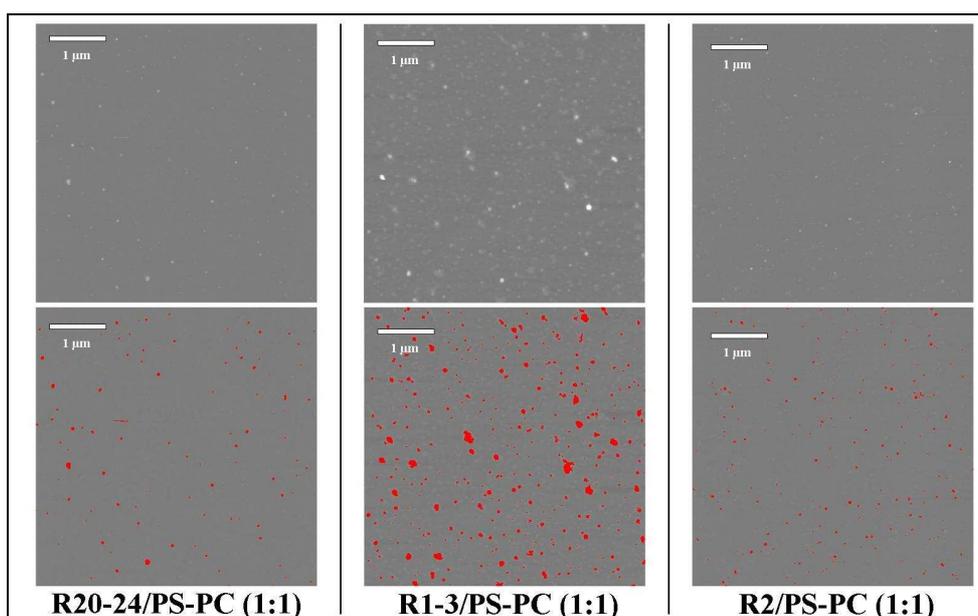


Figure 2 – Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) des prélèvements de couches mixtes : R20-24/PS-PC(1 :1), R1-3/PS-PC(1 :1) et R2/PS-PC(1 :1), pour une pression avant injection de 20 mN/m (les hauteurs varient entre -10 et +10 nm). En bas, sur les mêmes images, les objets dont la hauteur est supérieure à 0.3 nm sont marqués en rouge.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

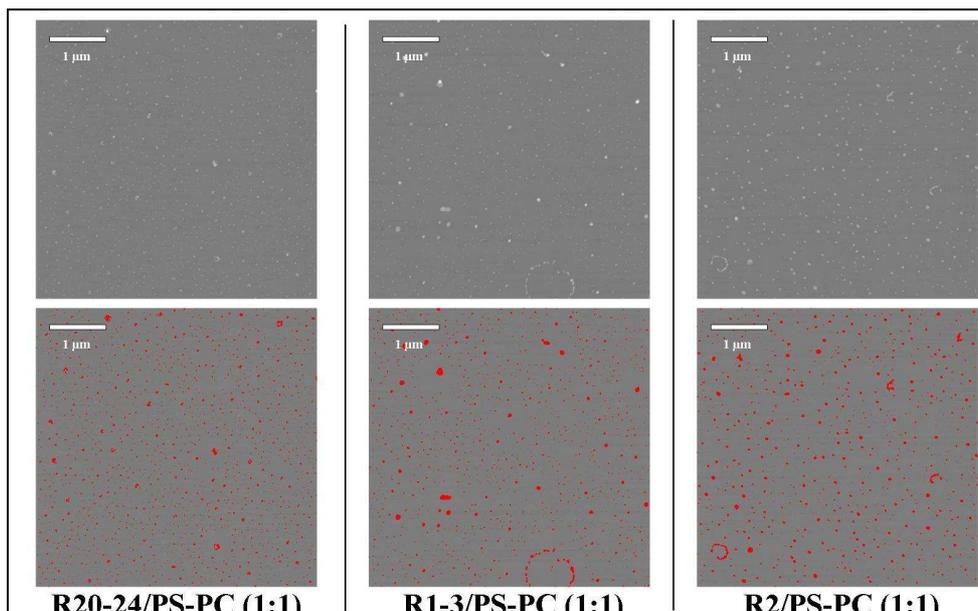


Figure 3 – Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) des prélèvements de couches mixtes : R20-24/PS-PC(1 :1), R1-3/PS-PC(1 :1) et R2/PS-PC(1 :1), pour une pression avant injection de 30 mN/m (les hauteurs varient entre -10 et +10 nm). En bas, sur les mêmes images, les objets dont la hauteur est supérieure à 0.3 nm sont marqués en rouge.

1.2.3 Résultats sur R1-3

La surface occupée par les particules créées par R1-3 sur les couches de lipides purs ainsi que le nombre de ces particules montrent clairement que l'interaction de ce fragment avec les phospholipides est basée sur une force électrostatique produite par le lipide chargé négativement DOPS. La surface d'occupation est ainsi de 2.1% pour 900 particules dans DOPS, tandis que cette surface est de 0.5% pour 140 particules dans DOPC.

Nous constatons que dans une couche de DOPS/DOPC à une pression initiale de 30 mN/m, la surface occupée par les particules protéiques représente 2.2% pour R1-3, valeur très proche de la surface de 2%, dans le cas de R20-24. Cependant, le nombre de particules protéiques est plus faible, avec 920 pour R1-3 contre 1230 pour R20-24. Nous en concluons que R1-3 possède une bonne affinité pour la couche où R20-24 s'insère le mieux, ce qui montre une nouvelle fois la présence d'interactions électrostatiques entre R1-3 et les couches lipidiques. Cependant, pour la même surface occupée par les particules protéiques, le plus faible nombre de particules indique que les interactions entre protéines jouent un rôle plus important pour la stabilisation de R1-3 dans la couche lipidique que pour celle de R20-24.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

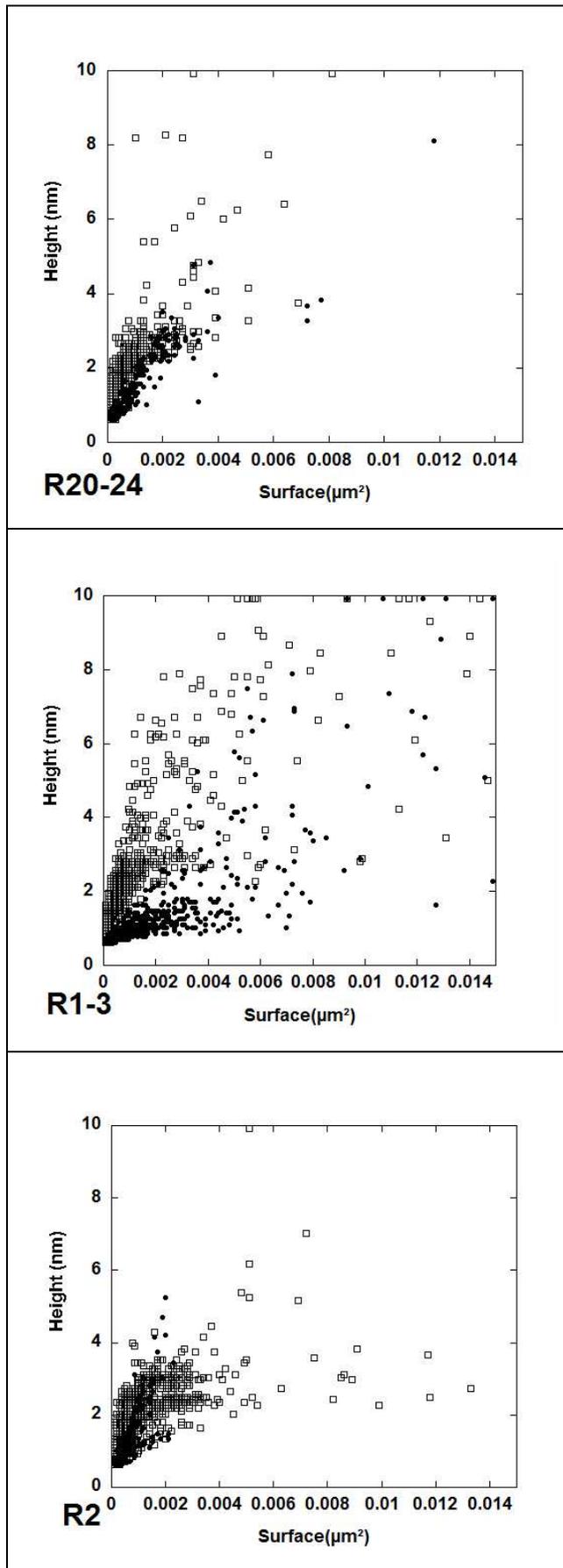


Figure 4 – Graphes de la hauteur des objets en fonction de leur surface, sur les images AFM de R20-24/PS-PC(1 :1), R1-3/PS-PC(1 :1) et R2/PS-PC(1 :1), pour une pression initiale de 30 mN/m (\square), et 20 mN/m (\bullet). Chaque point correspond à la valeur de la surface et de la hauteur pour un objet.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

A une pression initiale de 20 mN/m, la surface occupée par les particules protéiques est clairement plus forte pour R1-3 que pour R20-24, avec une valeur de 3.3% pour R1-3 contre 0.5% pour l'autre fragment. Le nombre de particules créées par les protéines augmente également mais dans une plus faible proportion, avec 430 pour R1-3 contre 120 pour R20-24. Les hauteurs plus importantes des particules dans la couche préparée à 30 mN/m que dans celle préparée à 20 mN/m montrent, comme dans le cas de R20-24, que la protéine est plus insérée dans la couche à 20 mN/m que dans celle à 30 mN/m. Cependant la différence semble toutefois plus nette pour R1-3 que pour R20-24. Nous constatons de plus que la croissance de la hauteur en fonction de la surface est plus rapide à 30 mN/m qu'à 20 mN/m. L'interaction latérale des segments en sous-phase conduit à leur organisation et entraîne une augmentation de la hauteur des particules. Ainsi contrairement à R20-24, R1-3 de part son amphiphilicité a la possibilité de se lier fortement aux couches de lipides à 20 mN/m, qui sont moins compactes qu'à 30 mN/m. Nous constatons également que contrairement à R20-24, la quantité de protéines interagissant avec la couche augmente quand la pression initiale diminue.

Nous en concluons que, de la même façon que R20-24, R1-3 se lie à la couche lipidique par l'intermédiaire des interactions électrostatiques avec les têtes polaires des lipides chargés négativement. Cependant, contrairement au fragment étudié précédemment, celui-ci s'insère en plus grande quantité dans la couche lipidique quand sa compacité diminue, grâce à son amphiphilicité. Les interactions créées entre les protéines sont également plus fortes.

1.2.4 Résultats sur R2

Selon la même méthode que pour R1-3, nous montrons clairement que la liaison de R2 avec les phospholipides est basée sur une interaction électrostatique avec le lipide chargé négativement DOPS, puisque la surface occupée par les particules protéiques sur les couches de lipides purs ainsi que le nombre de ces particules sont nettement plus forts dans DOPS que dans DOPC. La surface d'occupation est ainsi de 1.2% pour 595 particules dans DOPS, contre 0.1% pour 110 particules dans DOPC. La plus faible quantité de particules et la plus faible surface qu'elles occupent dans DOPS, dans le cas de R2 par rapport à R1-3, pourraient indiquer que l'interaction électrostatique avec le lipide est plus faible pour ce fragment que pour le précédent, mais nous ne pouvons affirmer cela sans tenir compte du fait que la taille de R1-3 est trois fois supérieure à celle de R2.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l’Apo A-I à celles d’autres protéines.

Dans le cas du mélange DOPS/DOPC (1 :1), nous constatons que la surface occupée par les objets protéiques dans le cas de R2 est supérieure à celle obtenue pour R1-3 et R20-24, avec respectivement 3% contre 2.2% et 2%, mais le nombre de particules y est plus faible, avec respectivement 690 contre 920 et 1230. Les interactions entre protéines sont donc plus fortes pour R2 que pour les deux autres fragments et stabilisent davantage celui-ci dans la couche. Nous constatons que l'amphiphilicité de R2 ne lui permet pas d'interagir avec la couche lipidique autant que R1-3, puisque la surface d'occupation diminue quand la pression du lipide avant injection est plus faible. Ainsi, R2 crée seulement 220 particules avec une surface d'occupation de 0.5%, dans un mélange DOPS/DOPC (1 :1) à 20 mN/m, contre 430 particules avec une surface de 3.3% pour R1-3. De plus, nous pouvons constater d'après les graphes de la hauteur contre la surface, que R2 et R20-24 ont tendance à s'insérer moins profondément dans la couche à 20 mN/m que R1-3.

Pression initiale.	Lipides	Nombre moyen de particules (% surface totale)		
		R20-24	R1-3	R2
20 mN/m	PC/PS 1 :1	120 (0.5)	430 (3.3)	220* (0.5)*
30 mN/m	PC/PS 1 :1	1230 (2)	920 (2.2)	690 (3)
	PS pur		900 (2.1)	595 (1.2)
	PC pur		140 (0.5)	110 (0.1)

*Tableau 1 – Mesures sur les images AFM des couches mixtes protéines/lipides, pour des pressions avant injection de 20 mN/m et 30 mN/m. Le nombre moyen de particules par image et le pourcentage de la surface occupée par ces particules sont indiqués. Les valeurs repérées par * ont été obtenues en analysant une seule image AFM.*

R20-24, R1-3 et R2 créent des interactions électrostatiques avec DOPS qui sont comparables et qui permettent à ces protéines de se lier aux mélanges de lipides DOPS/DOPC. L'analyse de la hauteur des particules montre que ces interactions se réalisent en sous-phase. Ceci est en accord avec les mesures PM-IRRAS qui ont montré, sur R20-24,

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

l'absence de protéines à l'interface du fait d'une part, que le signal sur les amides I et II est faible et d'autre part, que le signal des liaisons C=O présentes sur les têtes des lipides ne montre pas de changement important de la compacité du lipide. Les mesures PM-IRRAS montrent de plus une réorientation des liaisons COO⁻ présentes sur les têtes phosphatidylsérines, ce qui indique une interaction protéine – lipides en sous-phase (9).

Nous constatons que R1-3 occupe une place plus importante dans une couche de DOPS pure que R2. Cependant, dans certaines couches lipidiques où la densité des charges négatives est également élevée (c'est-à-dire, le mélange DOPS/DOPC (1 :1) à une pression initiale de 30mN/m), les interactions entre protéines permettent à R2 de mieux se stabiliser que R1-3. De même, il semble que R1-3 crée des interactions protéine - protéine plus fortes que R20-24.

Quand la compacité du mélange PS/PC diminue, nous constatons que les trois fragments sont plus insérés dans la couche de lipides car, dans cette situation, le caractère amphiphile des protéines joue un rôle important pour permettre leur présence à l'interface liquide/lipides (voir figure 5). R1-3 a la possibilité, que n'ont pas les deux autres fragments, de s'insérer en grande quantité dans la couche lipidique sous l'effet de son amphiphilicité, ce qui permet à R1-3 d'augmenter sa présence dans le mélange DOPS/DOPC lorsque la compacité de la couche lipidique diminue.

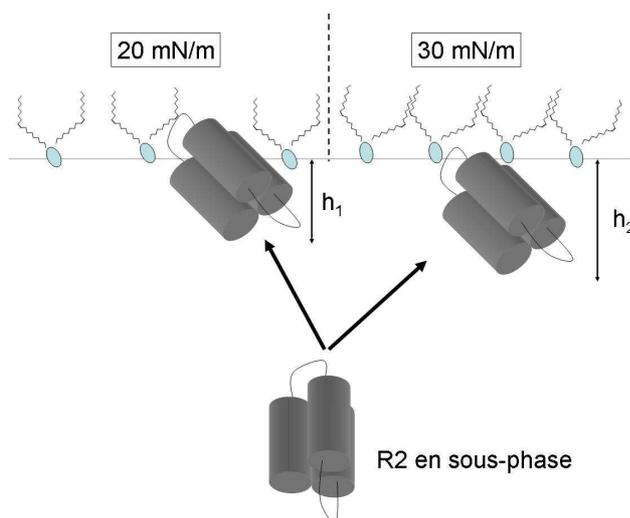


Figure 5 – Modèle d'interaction des protéines R2, R1-3 et R20-24 avec les lipides pour 20 mN/m (à gauche) et pour 30 mN/m (à droite). Sur le schéma, seul R2 est représenté. h_1 et h_2 représentent la hauteur des particules visibles à l'AFM.

1.3. Relation entre hauteur et surface pour les particules créées par l'Apo A-I

Nous venons de caractériser le comportement interfacial de trois fragments du domaine central de la dystrophine : R2, R1-3 et R20-24. Pour ces trois protéines, la liaison avec le lipide nécessite une interaction électrostatique. Cependant, la présence de ces protéines dans la couche lipidique peut parfois être accentuée par leurs caractères amphiphiles, ce qui conduit à leur insertion dans la couche. Lorsque la pression de la couche de lipides PS/PC augmente, les têtes polaires se rapprochent et d'une part limitent l'insertion des protéines, d'autre part provoquent une augmentation de la densité de charges négatives en surface. L'adsorption de la protéine à l'interface liquide/lipides dépend alors davantage d'une interaction électrostatique en sous-phase. Dans ce cas là, la protéine est plus en interaction avec les têtes polaires et les hauteurs des particules sont plus élevées.

Les résultats du troisième et du quatrième chapitre montrent que l'interaction de l'Apo A-I avec DPPG est principalement de nature électrostatique. Par contre, les mesures ellipsométriques et tensiométriques montrées au chapitre 3 indiquent que l'Apo A-I s'insère entre les phospholipides dans une couche de DPPG, quelque soit sa pression initiale. Nous avons donc voulu savoir si la hauteur des particules protéiques dans la couche de DPPG était modifiée par l'augmentation de la pression initiale.

Ainsi, nous avons tracé le graphe de la hauteur des particules en fonction de leur surface pour une couche mixte Apo A-I/DPPG (voir figure 6) avec des pressions avant injection de 15 mN/m et de 30 mN/m. Les images ont été seuillées à une hauteur de 1.4 nm (NDG 140) au dessus de la phase LC (comme pour l'étude précédente, voir chapitre 3 section 2.2). A titre de comparaison nous avons également tracé ce graphe pour une couche mixte Apo A-I/DOPC (voir figure 6) avec les mêmes pressions initiales. Deux seuils ont été utilisés : une hauteur de 1.4 nm au dessus du lipide (NDG 140) et une hauteur de 1 nm de plus (NDG 149, suivi d'une correction des hauteurs) pour tester l'influence de la différence d'épaisseur entre DOPC et DPPG. Nous ne considérons pas ici les particules présentes dans DPPC du fait de la faible interaction de la protéine avec la couche lipidique à 30 mN/m. Les images utilisées pour ce traitement sont les mêmes que celles qui furent utilisées pour l'analyse de la forme des particules exposée au chapitre 3.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

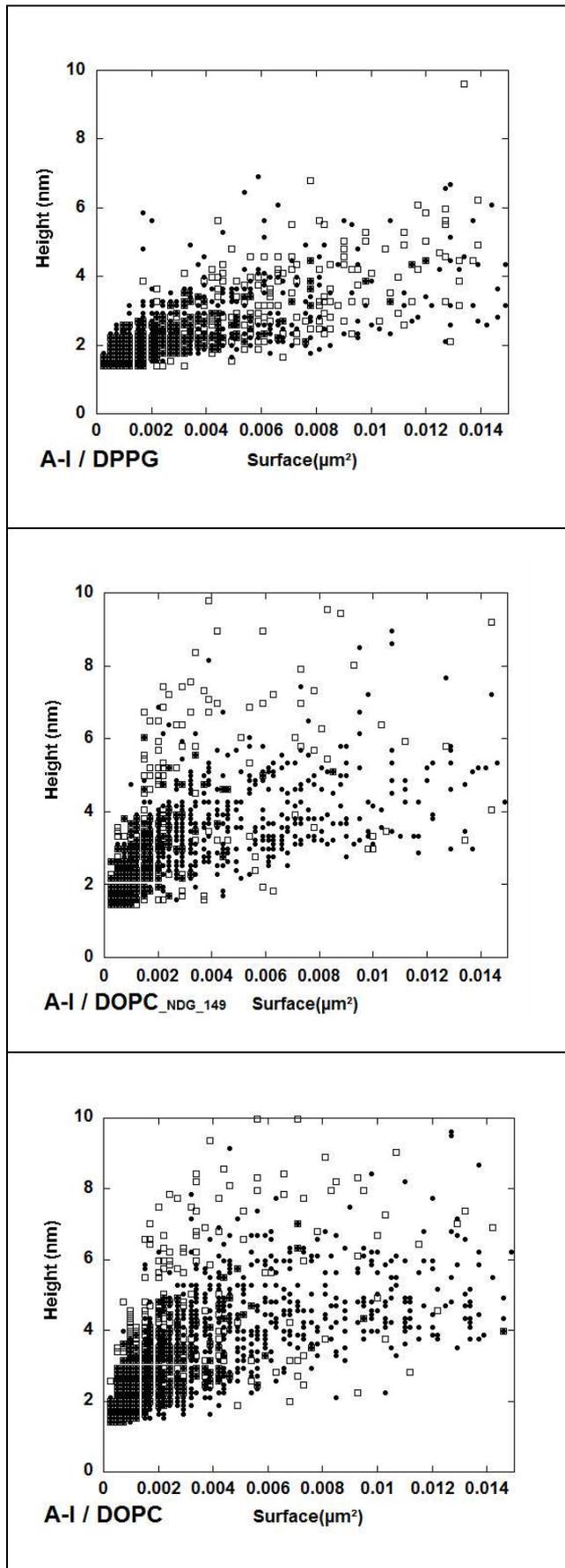


Figure 6 – Graphes de la hauteur des objets en fonction de leur surface, sur les images AFM de Apo A-I/DPPG, Apo A-I/DOPC (NDG 149 + correction des hauteurs) et Apo A-I/DOPC (NDG 140), pour une pression initiale de 30 mN/m (\square) et 15mN/m (\bullet). Chaque point correspond à la valeur de la surface et de la hauteur pour une particule.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

Nous observons que pour une même surface les particules ont des hauteurs plus élevées dans DOPC que dans DPPG, quelque soit la pression initiale et quelque soit le seuillage utilisé. Au chapitre 3, les distributions des hauteurs, des surfaces et des périmètres des particules créées par l'Apo A-I sur les trois lipides utilisés avaient déjà été étudiées. Nous avons conclu que seule la distribution des hauteurs possède des différences significatives, qui ne dépassent pas une valeur de 10% sur le nombre de particules associées à chaque hauteur. En conséquence, la distribution de ces trois paramètres est similaire dans les trois lipides. Ainsi, l'observation de la hauteur de chaque particule en fonction de sa surface a permis de faire apparaître plus précisément une tendance fine observée sur la distribution individuelle de chaque paramètre. Cet aplatissement des particules ne peut être lié qu'à un regroupement global de l'ensemble des résidus de la protéine près des têtes polaires. Ainsi, dans le cas de DOPC, les résidus de l'Apo A-I s'étendent davantage vers la sous-phase ou au dessus de la partie hydrocarbonée du lipide. Nous observons donc une influence de la charge sur la hauteur des particules qui opère dans le sens inverse de celle qui fut constatée sur les fragments R2, R1-3 et R20-24.

Nous ne constatons pas de changement dans la hauteur des particules insérées dans la couche de DPPG lorsque nous modifions la pression initiale. Si l'influence des interactions électrostatiques créées par les têtes polaires anioniques devenait négligeable, lorsque la densité des têtes diminue à la surface de la cuve, alors nous verrions une augmentation de la hauteur des particules formées par l'Apo A-I. Ce résultat met une nouvelle fois en évidence que les interactions électrostatiques dominent le caractère amphiphile de la protéine lorsque l'Apo A-I interagit avec DPPG. Nous avons constaté une diminution de l'adsorption de la protéine à l'interface liquide/DPPG lorsque la pression initiale augmente, ce qui montre que la protéine doit insérer une partie de ses résidus dans la couche lipidique pour interagir avec DPPG. En observant la hauteur des particules en fonction de la pression initiale de la couche lipidique, nous confirmons également que les protéines ne privilégient pas les interactions en sous-phase lorsque les têtes polaires se rapprochent.

II. Comparaison de l'Apo A-I à l'Apo A-II

La différence d'affinité entre la phase LE et la phase LC des lipides zwitterioniques est une des principales caractéristiques de l'Apo A-I qui furent démontrées aux chapitres précédents. Il est donc intéressant de savoir si cette propriété change pour les autres protéines de la famille des apolipoprotéines échangeables, et si c'est le cas, selon quel degré de variation. Ainsi, dans cette partie, nous avons caractérisé l'interaction de l'apolipoprotéine échangeable Apo A-II avec une couche de DPPC en présence de la coexistence des phases. Des mesures ellipsométriques et tensiométriques ont été réalisées sur l'adsorption de cette protéine à l'interface liquide/DPPC, pour une pression avant injection de 15 mN/m, et l'analyse de la répartition et de la distribution de la forme des particules protéiques visibles par microscopie AFM a été réalisée sur un prélèvement de la couche mixte Apo A-II/DPPC. Ces résultats furent comparés à ceux obtenus sur l'Apo A-I.

2.1 Mise en évidence de l'insertion de l'Apo A-II dans la couche de DPPC

La formation de la couche lipidique à la surface de la cuve et l'injection de la protéine sont réalisées selon le protocole utilisé pour les expériences avec l'Apo A-I. Nous enregistrons l'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique au cours de la cinétique d'adsorption de l'Apo A-II à l'interface liquide/DPPC, pour une pression initiale de 15 mN/m. Le système est considéré à l'état d'équilibre lorsque ces deux grandeurs atteignent une valeur stable dans le temps. L'augmentation de la pression de surface créée par Apo A-II est de 5 mN/m, et montre que la protéine s'adsorbe à l'interface liquide/lipides (voir figure 7). L'augmentation de l'angle ellipsométrique est de 0.3° (voir figure 7), ce qui est faible par rapport à l'augmentation de 4.8° créée par l'adsorption de cette protéine à l'interface liquide/air, alors que la concentration de protéines en sous-phase est identique (voir figure 7). Ainsi, nous constatons, comme pour le cas de l'Apo A-I (voir chapitre 3 section 1.1), que la surpression observée est trop forte pour être provoquée par une interaction en sous-phase de la

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

protéine. Nous en concluons que l'Apo A-II, ou une partie de ses résidus, s'insère dans la couche lipidique, entre les têtes polaires (10, 11).

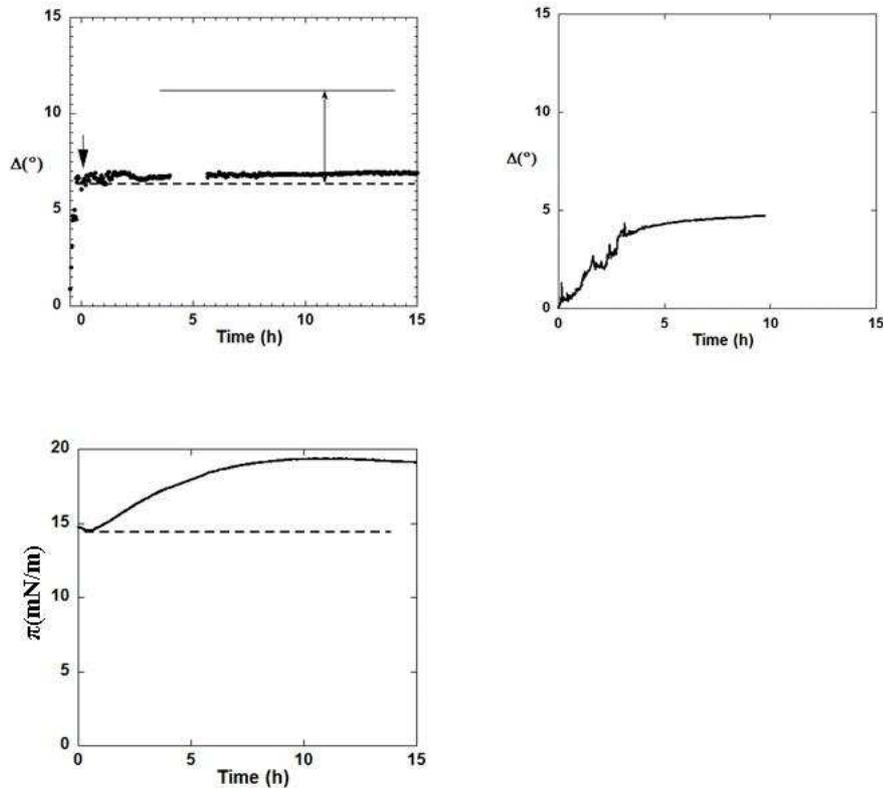


Figure 7 – Graphe de la valeur de l'angle ellipsométrique en fonction du temps lors de l'adsorption de l'Apo A-II à l'interface liquide/air (à droite). Graphes de la valeur de l'angle ellipsométrique (en haut, à gauche) et de la pression de surface (en bas, à gauche) en fonction du temps lors de l'adsorption de l'Apo A-II à l'interface liquide/DPPC, pour une pression avant injection de 15 mN/m. Les valeurs à l'équilibre montrent l'insertion de la protéine dans la couche de lipides.

2.2 Affinités de l'Apo A-I et de l'Apo A-II pour la phase LC de DPPC

Pour une monocouche de DPPC à la pression initiale de 15 mN/m, nous constatons que l'Apo A-II crée une surpression légèrement plus forte que l'Apo A-I, avec 5 mN/m contre 3.5 mN/m. La variation de l'angle ellipsométrique produite par l'Apo A-II est proche de celle produite par l'Apo A-I, avec 0.3° pour la première et 0.5° pour la seconde. Ceci semble

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

indiquer que les affinités des deux protéines pour cette couche lipidique sont semblables. Cependant, nous rappelons que les mesures ellipsométriques sur les couches mixtes Apo A-I/DPPC et Apo A-I/DOPC ne permettaient pas de révéler la différence sur la quantité de protéines insérée entre les deux lipides. Cette différence fut mise en évidence par l'observation des prélèvements des couches mixtes au microscope AFM.

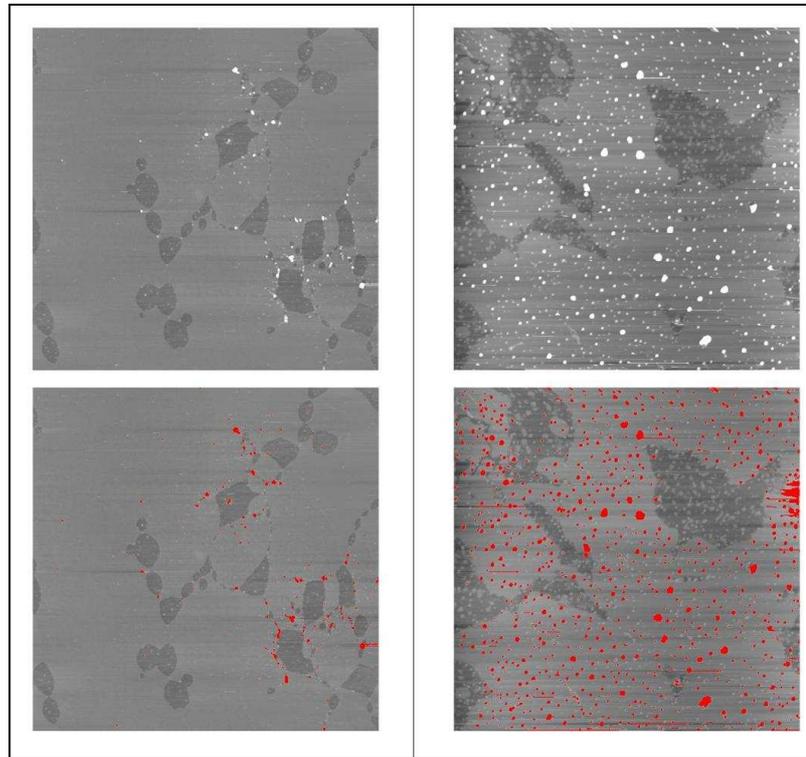


Figure 8 – En haut : images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des prélèvements des couches mixtes : Apo A-I/DPPC (à gauche) et Apo A-II/DPPC (à droite) (les hauteurs varient de -5 nm à $+5 \text{ nm}$). En bas : sur les mêmes images, les objets sélectionnés dans la phase LC sont marqués en rouge.

La figure 8 montre des images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des prélèvements de couches mixtes Apo A-I/DPPC et Apo A-II/DPPC, pour une pression initiale de 15 mN/m . Nous constatons une très forte différence dans la quantité de protéines insérée dans la phase LC de cette couche. Afin de quantifier cette différence d'insertion, nous avons mesuré la surface occupée par les particules protéiques dans la phase LC en seuillant l'image à une hauteur de 1.4 nm au dessus du lipide (NDG 140). Les valeurs de la surface résiduelle sur la couche de lipides purs, de la surface mesurée sur la couche mixte et de la surface occupée par les particules protéiques sont affichées dans le tableau 2, pour l'Apo A-I et pour l'Apo A-II. Ces mesures

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l’Apo A-I à celles d’autres protéines.

ont été réalisées sur au moins 6 images AFM de chaque couche mixte (quelques unes de ces images sont montrées en annexe 4). Elles montrent une différence significative dans la quantité de protéines interagissant avec la phase LC, entre l’Apo A-I et l’Apo A-II, avec respectivement 0.1% et 1.6% de la surface totale occupée par les particules protéiques (nous rappelons que la résolution latérale de l’image AFM ne peut pas affecter cette tendance de façon significative, voir annexe 5).

Nous constatons que l’Apo A-II s’insère en plus grande quantité dans la phase LC que la première apolipoprotéine étudiée. Cependant, nous ne voyons pas de forte différence dans la surpression créée par les deux protéines. Or, DPPC est un lipide qui se situe majoritairement dans la phase LC à la pression de 15 mN/m. Ceci laisse supposer que l’insertion de l’Apo A-II dans la couche de DPPC implique peu d’énergie dans les interactions avec le lipide et dans le changement de conformation de la protéine. Nous rappelons que cet effet avait déjà été mis en évidence au chapitre 3, lors de l’interaction de l’Apo A-I avec la phase LE des lipides zwitterioniques. Nous en avons conclu que l’Apo A-I s’insérait dans les zones LE de ces lipides en déplaçant les molécules d’eau retenues entre les têtes polaires des lipides de cette phase. Ainsi, nous émettons l’hypothèse que l’Apo A-II a la possibilité d’insérer des segments de petites tailles entre les têtes polaires des lipides en phase LC, pour déplacer les molécules d’eau qui subsistent encore dans cette phase.

	Surface occupée sur couches mixtes.	Surface occupée sur phospholipides purs.	Surface occupée par les particules protéiques.
DPPC+A-I (15 mN/m)	0.17 +/- 0.14	0.08 +/- 0.04	0.1 +/- 0.1
DPPC+A-II (15 mN/m)	1.7+/-1.8	0.08 +/- 0.04	1.6 +/- 1.8

Tableau 2 – Surfaces occupées par les particules (%) sur les couches de DPPC pures et sur les couches mixtes Apo A-I/DPPC et Apo A-II/DPPC, pour une pression initiale de 15 mN/m. Nous obtenons par soustraction la surface occupée par les particules protéiques. Les valeurs moyennes et les incertitudes (écart type) sont calculées sur au moins 6 images AFM.

2.3 Etude de la forme des particules visibles au microscope AFM

Nous avons comparé la forme des objets créés par l’Apo A-I et l’Apo A-II sur la couche de DPPC. La figure 9 montre la distribution des hauteurs, des surfaces et des périmètres des particules insérées dans la phase LC. Nous avons seuillé l’image à une hauteur de 1.4 nm au dessus du lipide (NDG 140). Les mesures ont été effectuées sur au moins 6 images de chaque couche mixte, sur 333 particules pour l’Apo A-I et sur 2655 particules pour l’Apo A-II (quelques unes de ces images sont montrées en annexe 4). Les distributions sur les particules formées par l’Apo A-II sont proches des distributions sur les particules formées par l’Apo A-I, puisque les variations sont inférieures à 10% et que les distributions s’étendent toujours à peu près jusqu’aux mêmes valeurs. Cependant, des différences entre les deux protéines apparaissent sur les histogrammes des trois paramètres. Nous constatons que l’Apo A-II privilégie la formation d’objets de grande taille comparée à l’Apo A-I. Ainsi les objets de plus faible hauteur, surface et périmètre ont une proportion environ deux fois plus faible pour les particules créées par l’Apo A-II que pour celles créées par l’Apo A-I. Or, nous précisons que l’Apo A-II est plus petite que l’Apo A-I et devrait avoir la distribution des hauteurs qui décroît la plus vite.

La figure 10-A présente le graphe de la hauteur des particules en fonction de leur surface pour les particules produites par l’Apo A-I et pour celles produites par l’Apo A-II, dans la phase condensée de DPPC. Le seuillage est le même que précédemment : la hauteur du seuil est de 1.4 nm (NDG 140). Nous constatons une nouvelle fois que l’Apo A-II crée des particules de surface et de hauteur plus élevées que l’Apo A-I, mais nous remarquons de plus, que le rapport entre la surface et la hauteur de ces objets reste en moyenne le même. L’accroissement de la surface des objets créés par l’Apo A-II implique donc une augmentation de leur hauteur de façon proportionnelle.

Le graphe de la figure 10-A montre ainsi une évolution de la hauteur des particules produites par l’Apo A-II en fonction de leur surface, qui ne ressemble pas au comportement observé sur le fragment de la dystrophine R1-3, ni à celui de l’Apo A-I, lorsque ces protéines s’insèrent dans la couche de lipides. L’augmentation de la hauteur en fonction de la surface est plus rapide, de plus nous obtenons une plus grande quantité de particules de grande hauteur et une plus faible quantité de particules de grande surface et de faible hauteur.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

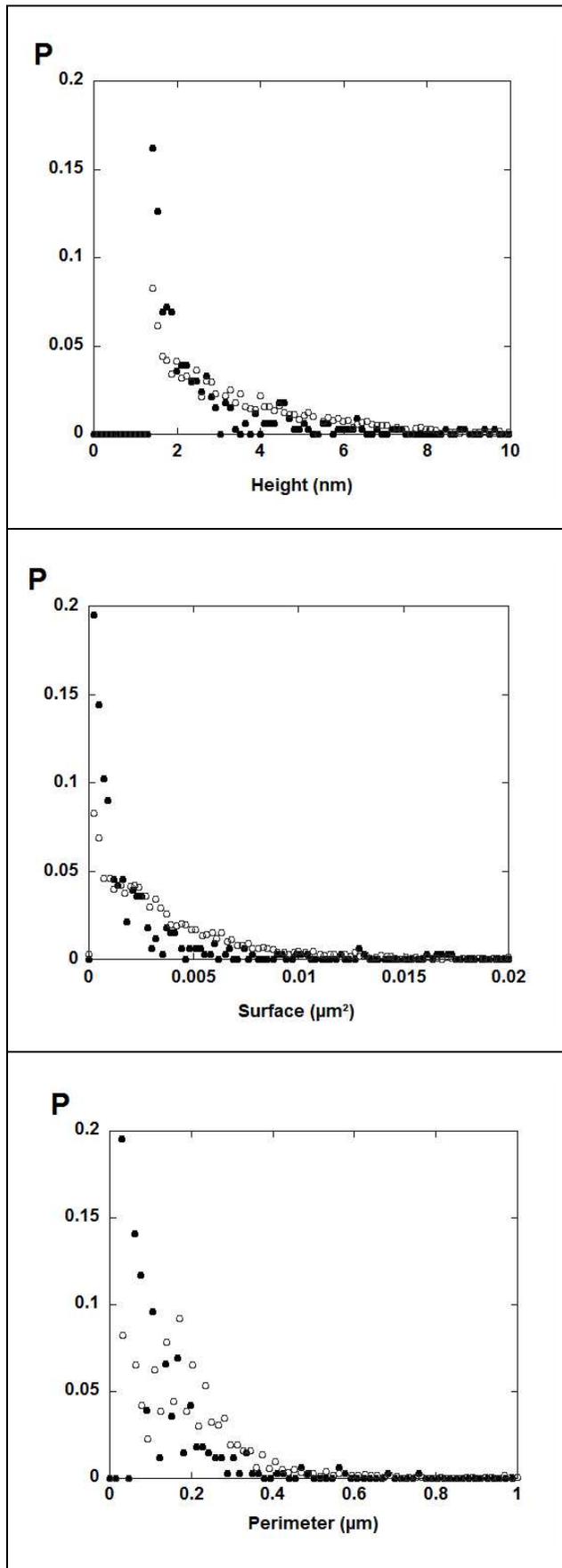


Figure 9 - Histogrammes normalisés de la hauteur, de la surface et du périmètre des objets pour : Apo A-I/DPPC (●) et Apo A-II / DPPC (○). Seuillage avec NDG = 140.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

Cette évolution est plus proche de celle qui est observée lors de l'interaction des fragments de la dystrophine en sous-phase avec la couche lipidique. Elle montre une organisation des segments de protéines qui ne sont pas insérés entre les têtes polaires, du fait d'interactions entre eux, conduisant à l'élévation de la hauteur des particules lorsque la quantité de protéines qui y sont présentes augmente. Il semble donc que l'Apo A-II insère une plus faible quantité de résidus entre les têtes polaires que l'Apo A-I. Le reste de la protéine serait soit en sous-phase, soit au dessus de la partie hydrocarbonée du lipide. Ceci pourrait expliquer d'une part, que l'Apo A-II s'insère beaucoup mieux dans la phase LC que l'A-I, et d'autre part, que les surpressions soient identiques bien que les surfaces occupées par les particules protéiques soient très différentes.

L'évolution de la hauteur des particules en fonction de leur surface a également été étudiée pour les objets présents dans la phase LE de DPPC. La figure 10-B montre cette évolution pour environ 1000 particules insérées dans les domaines LE de 6 images AFM. Les hauteurs des particules situées dans cette phase de la couche mixte Apo A-II/DPPC ont été comparées à celles situées dans la même phase du lipide pur (voir figure 11). Nous avons ainsi établi, qu'à partir d'une hauteur de 0.35 nm au dessus de la phase LC, les particules présentes dans la couche mixte ne pouvaient plus être attribuées à des domaines lipidiques. Ces particules sont donc les seules à être comptabilisées. Sur la figure 10-B, nous constatons une forte différence de hauteur entre les particules qui sont en phase LE et celles qui sont en phase LC. Ceci peut en partie être provoqué par la différence d'épaisseur entre les phases, dans la mesure où ces particules pourraient ne pas traverser la partie hydrocarbonée de la couche de lipides et se situer partiellement en sous-phase. La hauteur de ces particules a ainsi été rehaussée de 1 nm, afin de compenser ce changement d'épaisseur dans la couche de lipides. Cependant, nous constatons toujours (voir figure 10-C) que pour des particules de même surface, celles qui sont insérées dans la phase LE ont une plus faible hauteur que celles présentes dans la phase LC. Ceci démontre que l'Apo A-II est davantage insérée entre les têtes polaires des lipides de la phase LE qu'entre celles de la phase LC.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

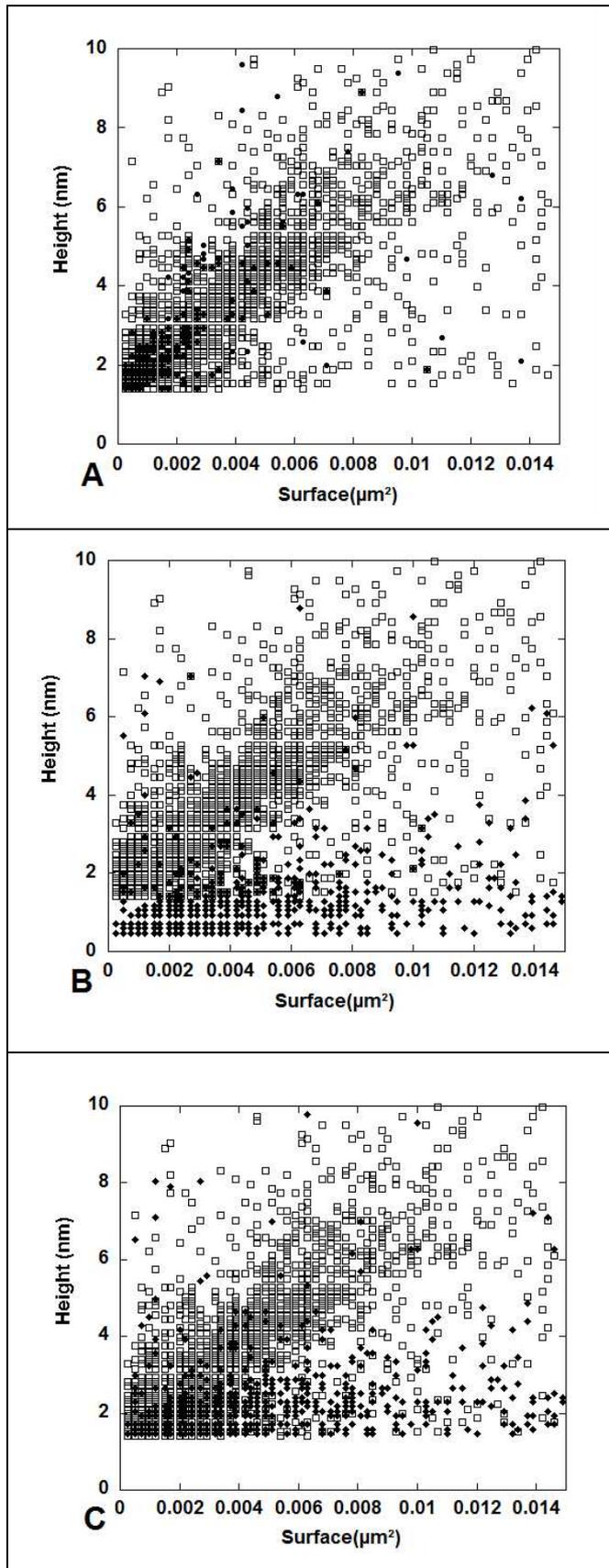


Figure 10 – Graphes de la hauteur des objets en fonction de leur surface, avec DPPC pour une pression initiale de 15 mN/m. **Graphe A :** Apo A-I (●) et Apo A-II (□) en phase LC. **Graphe B :** Apo A-II en phase LC (□) et en phase LE (◆). **Graphe C :** Apo A-II en phase LC (□) et en phase LE (◆), après avoir augmenté la hauteur des objets en phase expansée de 1 nm (différence d'épaisseur entre les phases).

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

Comme dans le cas de l'Apo A-I, nous ne savons pas si les résidus qui ne sont pas insérés entre les têtes polaires des lipides se situent dans la sous-phase, ou si ils se situent au dessus des chaînes des lipides. Ainsi, le passage de la phase LE à la phase LC pourrait provoquer une expulsion de certains résidus vers le milieu aqueux ou vers les régions hydrophobes à cause du rapprochement des têtes polaires. Ces résidus pourraient alors créer des interactions avec les chaînes acyl des lipides (dans le cas d'une expulsion vers les régions hydrophobes), ce qui produirait une interaction plus forte avec les lipides dans les zones LC qu'avec ceux dans les zones LE, du fait de l'organisation des chaînes acyl. Dans le cas d'une interaction forte, la protéine aurait alors une affinité plus importante pour la phase LC que pour la phase LE. Dans le cas d'une interaction faible avec les lipides, la phase LE permettrait à la protéine de stabiliser davantage ses segments amphiphiles en les plaçant entre les têtes polaires, à l'interface hydrophile/hydrophobe, ce qui produirait une insertion préférentielle de la protéine dans la phase LE.

Nous allons, dans la suite de ce travail, estimer la différence d'affinité entre les phases grâce à l'analyse statistique de la distribution spatiale des particules.

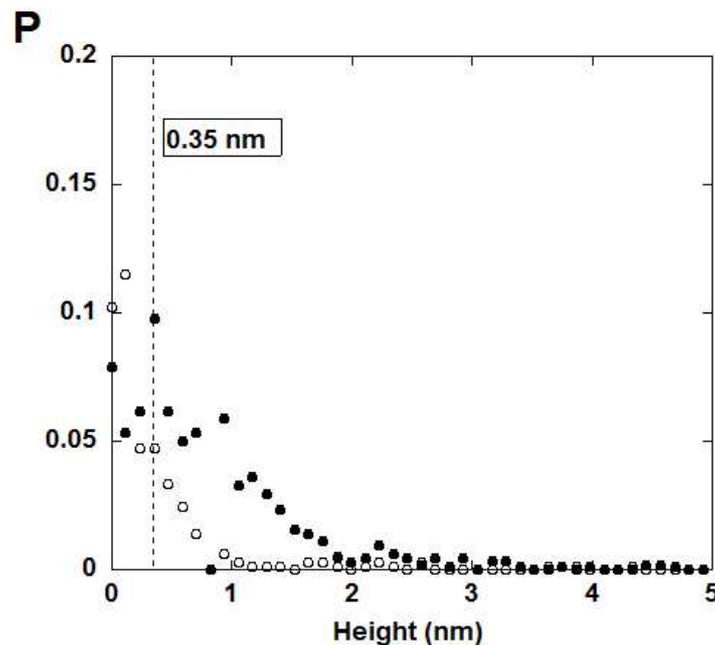


Figure 11 - Histogrammes normalisés de la hauteur des particules en phase LE pour DPPC pur (\circ) et pour Apo A-II/DPPC(\bullet) (15 mN/m). Sur le lipide pur, les seuls objets visibles sont les domaines LC formés dans la phase LE : leur proportion est faible pour une hauteur supérieure à + 0.35 nm par rapport aux lipides en phase LC. Sur le lipide avec protéines, nous excluons les objets inférieurs à cette hauteur quand nous comptabilisons les particules en phase LE sur la couche mixte.

2.4 Estimation de l'influence de la phase dans DPPC

La distribution spatiale des objets créés par la protéine a été analysée sur un prélèvement de couche mixte Apo A-II/DPPC, dont la pression initiale est de 15 mN/m. Nous avons déjà constaté grâce aux études précédentes que l'Apo A-II était beaucoup plus présente dans la phase LC de ce lipide que l'Apo A-I. Nous voulons maintenant déterminer plus précisément l'influence de la coexistence des phases sur la distribution de l'Apo A-II.

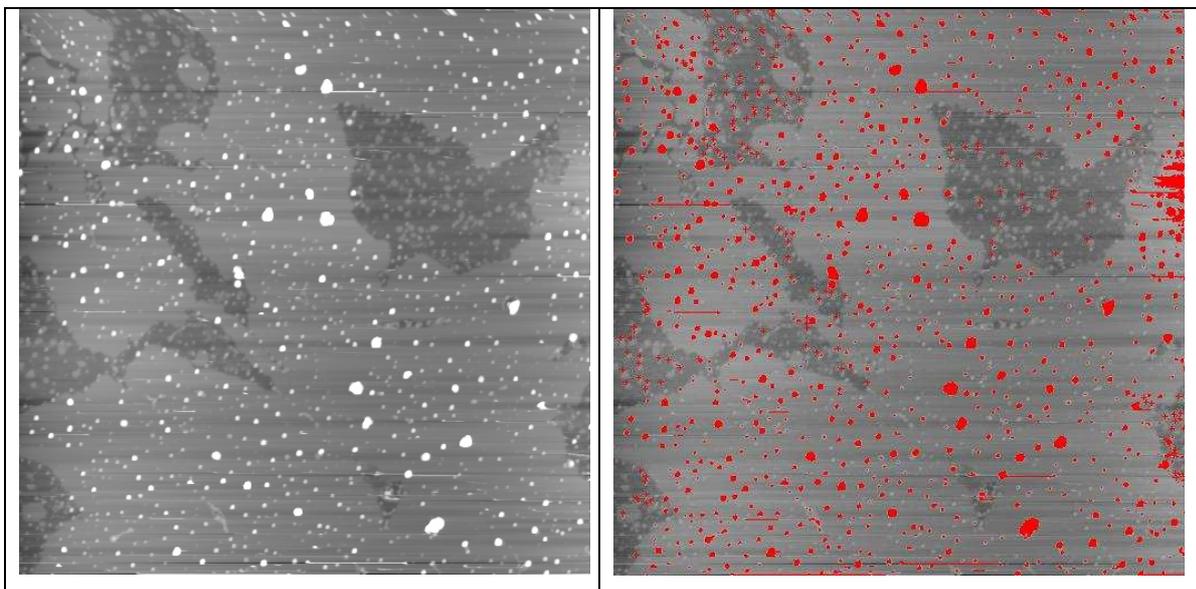


Figure 12 – A gauche : image AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) du prélèvement d'une couche mixte Apo A-II / DPPC, pour une pression avant injection de 15 mN/m. A droite : sur la même image, les objets sont sélectionnés en rouge dans la phase LC et marqués par une croix rouge dans la phase LE.

Dans un premier temps, nous avons comparé la distribution des particules à une distribution de disques durs répartis aléatoirement sur l'image. Ainsi, pour l'image présentée sur la figure 12, nous montrons sur la figure 13 deux types de distribution :

1°) La distribution expérimentale des particules sur l'image AFM. La détermination du nombre de particules en phase LE est très importante ici, puisque nous n'avons pour l'instant aucune information sur la phase possédant la meilleure affinité. Nous utilisons donc des images avec une forte résolution en hauteur (la hauteur varie de -5 nm à +5nm pour 256

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

NDG) de manière à mieux séparer les particules en phase LE de celles présentes dans la phase LC. Nous seuillons les particules au dessus de la phase LC à une hauteur de 1.4 nm (NDG 165). Pour la phase LE, nous seuillons les particules à hauteur variable, afin, pour chaque domaine, de prendre en compte le maximum de particules. Après comparaison de la distribution des hauteurs des particules dans la phase LE de la couche mixte et du lipide pur (voir figure 14), nous ne sélectionnons que les particules supérieures à une hauteur de 0.5 nm par rapport à la phase LC (NDG 140). Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{Exp}$, $D(r)_{Exp}$ et $V(r)_{Exp}$.

2°) Une distribution simulée et aléatoire de disques « durs », de surface non nulle, sur une image de la taille de l'image AFM. La densité de disques correspond à la densité de particules sur l'image expérimentale en tenant compte des deux phases et la fonction statistique utilisée pour générer la taille des disques est obtenue à partir de la distribution expérimentale du diamètre des particules (voir figure 14). Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_H$, $D(r)_H$ et $V(r)_H$.

Ces distributions prennent en compte 981 particules et nous avons réalisé des tests de reproductibilité sur cinq autres images AFM provenant du même prélèvement mixte (quelques unes de ces images sont montrées en annexe 4).

La proximité entre les $g(r)$ des distributions expérimentale et aléatoire montre clairement l'absence d'interactions à longue distance entre les particules. Les courbes de $D(r)$ sont également proches, mais montrent tout de même une différence, qui n'est pas toujours reproductible sur les autres images. Cette différence pourrait être provoquée par une densité de particules plus faible sur certaines zones de l'image. $V(r)_{exp}$ est très proche de $V(r)_H$, cependant, la coexistence de phase influencera beaucoup moins la distribution des vides, dans le cas d'une insertion préférentielle en phase LC par rapport à une insertion préférentielle en phase LE, comme pour l'Apo A-I. Ceci tient du fait que DPPC est majoritairement en phase LC à cette pression là.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I
à celles d'autres protéines.

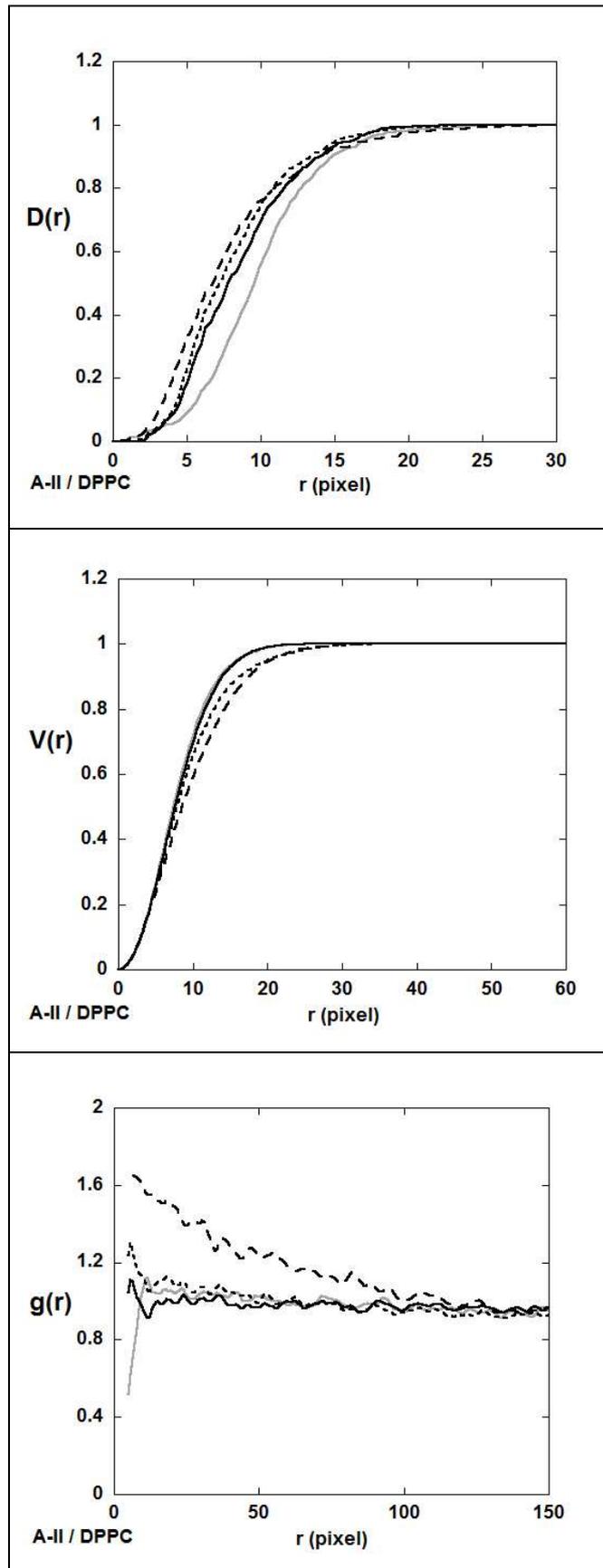


Figure 13 - Graphes de $D(r)$ (A), $V(r)$ (B) et $g(r)$ (C) pour l'image AFM de la couche mixte Apo A-II/DPPC montrée sur la figure 12, après élimination des particules pouvant être des domaines LC de taille nanométrique. La distribution de disques (sans préférence de phase) est en **trait plein noir** et la distribution expérimentale en **trait plein gris**. La distribution aléatoire de disques avec une probabilité 5 fois plus forte de s'insérer en phase LE qu'en phase LC est en **trait pointillé long** et en **trait pointillé court** quand elle est 5 fois plus faible.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

Afin de quantifier l'influence de cette phase, nous comparons donc la distribution expérimentale à une distribution aléatoire de disques sur laquelle, nous avons soit :

1°) Éliminé un disque sur cinq dans la phase LC, tout en conservant à la fin de la distribution un nombre de disques proche du nombre de particules présentes sur l'image AFM. Nous simulons ainsi une répartition des particules avec une probabilité cinq fois plus forte de s'insérer en phase LE qu'en phase LC. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{1-5_LC}$, $D(r)_{1-5_LC}$ et $V(r)_{1-5_LC}$.

2°) Éliminé un disque sur cinq dans la phase LE, tout en conservant à la fin de la distribution un nombre de disques proche du nombre de particules présentes sur l'image AFM. Nous simulons alors une répartition des particules avec une probabilité cinq fois plus forte de s'insérer en phase LC qu'en phase LE. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{1-5_LE}$, $D(r)_{1-5_LE}$ et $V(r)_{1-5_LE}$.

Pour la même image AFM que l'étude précédente, la figure 13 présente les graphes de $D(r)$, $V(r)$ et $g(r)$ pour la distribution expérimentale, la distribution aléatoire de disques durs (sans préférence de phase) et les deux nouvelles distributions aléatoires montrant une insertion plus importante en phase LE ou en phase LC. Nous avons réalisé des tests de reproductibilité sur quatre autres images AFM provenant du même prélèvement.

Sur les 5 images étudiées : $g(r)_{Exp}$ est encadrée par $g(r)_{1-5_LC}$ et $g(r)_{1-5_LE}$, $D(r)_{Exp}$ est encadrée par $D(r)_{1-5_LC}$ et $D(r)_{1-5_LE}$ et pour finir $V(r)_{Exp}$ est également encadrée par $V(r)_{1-5_LC}$ et $V(r)_{1-5_LE}$. Pour ce groupe d'images, nous constatons que la distribution expérimentale a tendance à être plus proche de la distribution aléatoire des disques qui n'est pas influencée par la phase, que de l'une ou l'autre des tendances. Pour l'image donnée en exemple, le graphe de $V(r)$ montre une distribution des vides sur l'image AFM qui est très proche de la distribution des disques sans effet de phase et montre en même temps une différence nette avec le comportement où l'insertion est 5 fois plus probable en phase LE ou en phase LC. La distribution des disques sans influence de la phase a également un comportement proche de l'expérience sur $D(r)$ et $g(r)$, comparativement aux deux tendances. Ceci indique que l'influence de la phase pourrait être déterminée avec plus de précision avec cette méthode d'analyse statistique, et notamment grâce à l'étude de $V(r)$, mais nécessite un système suffisamment reproductible (même tendance observée sur un grand nombre d'images).

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

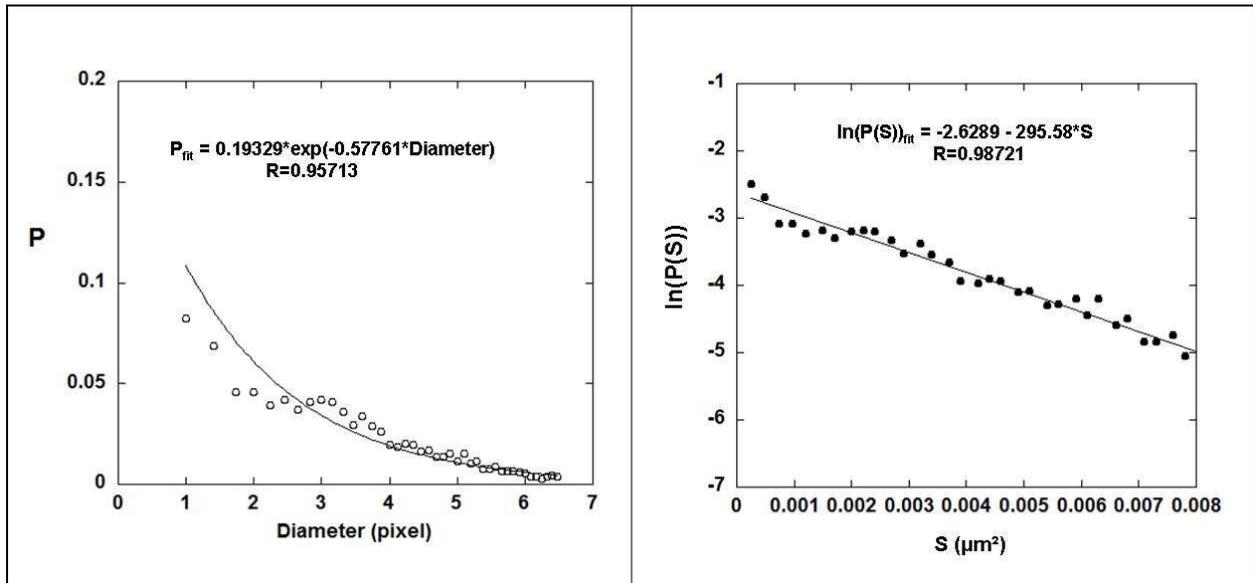


Figure 14 – A gauche : histogramme de la probabilité $P(D)$ d'obtenir une particule de diamètre D sur les images AFM de couches mixtes Apo A-II/DPPC. L'ajustement de cette distribution expérimentale nous permet d'obtenir une loi de distribution pour la simulation des disques (P_{fit}). A droite : graphe du logarithme de la probabilité $P(S)$ d'obtenir une particule de surface S , en fonction de S . En haut, nous avons l'équation correspondant à l'ajustement des ces points par l'équation 6 du chapitre 3 section 2.4. Ces mesures ont été réalisées sur 12 images AFM (2655 particules).

Nous en concluons que, si l'Apo A-II s'insère en plus grande quantité dans l'une des phases, le rapport entre la probabilité de s'insérer dans la phase la plus occupée et celle de s'insérer dans l'autre phase est inférieur à 5. A titre de comparaison, pour l'Apo A-I nous avons mesuré une surface d'occupation dans Apo A-I/DOPC plus de dix fois supérieure à celle mesurée dans la phase LC de Apo A-I/DPPC, quand la pression initiale est de 15 mN/m, ce qui représente un rapport entre les probabilités d'insertion supérieur à 10.

Les particules créées par l'Apo A-II ont une distribution des tailles qui est en bon accord avec le modèle d'auto-assemblage présenté au chapitre 3. En effet, l'ajustement de la distribution des surfaces par l'équation présentée au chapitre 3 section 2.4, donne une valeur de R supérieure à 0.98 (voir figure 14). Comme nous venons de montrer l'absence d'interaction à longues distances entre ces particules, nous en concluons que premièrement, la formation d'une particule dans la couche de lipides est indépendante de la proximité des autres particules, et deuxièmement, que cette formation implique une étape de nucléation où un seul dimère d'Apo A-II vient s'insérer dans la couche lipidique. Ainsi, la diminution de

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

l'influence de la phase sur l'Apo A-II comparativement à l'Apo A-I, qui fut observée dans la couche de DPPC, existe également à l'échelle de la molécule unique.

Discussion / Conclusion relatives au chapitre 5

Nous avons étudié trois protéines R2, R1-3 et R20-24, qui correspondent à des fragments du domaine central de la dystrophine. Ces protéines sont constituées de motifs répétés, ressemblant au motif de la spectrine. Chaque motif correspond à trois hélices α associées ensemble dans un arrangement compact et anti-parallèle. Le domaine R1-3 comporte 3 répétitions de ce motif et R2 correspond à la deuxième répétition présente sur ce domaine. R20-24 comporte 5 répétitions de motifs homologues (2, 3).

Par l'intermédiaire, premièrement des mesures de la surface occupée et du nombre de particules créés par ces protéines dans les couches de lipides et deuxièmement du changement de forme des particules créées par les protéines, lorsque les pressions initiales sont différentes, nous avons mis en évidence des propriétés interfaciales spécifiques pour R2, R1-3 et R20-24. Ces trois fragments créent des interactions électrostatiques avec DOPS, qui leur permettent de se lier aux couches lipidiques. Cependant, les interactions entre protéines donnent la possibilité à R2 de mieux se stabiliser que R1-3 dans certaines de ces couches (mélange DOPS/DOPC (1:1) à 30 mN/m). De même, il semble que R1-3 crée des interactions protéine - protéine plus fortes que R20-24. L'interaction électrostatique peut être accompagnée par une insertion dans la couche lipidique du fait de l'amphiphilicité de la protéine. Ceci permet à R1-3, mais pas aux autres fragments, d'augmenter sa présence dans le mélange DOPS/DOPC lorsque sa compacité diminue.

Nous avons ainsi identifié un comportement global pour ces trois fragments. Lorsque la pression de la couche de lipides PS/PC augmente, les têtes polaires se rapprochent, ce qui d'une part limite l'insertion des protéines, d'autre part provoque une augmentation de la densité de charges négatives en surface. L'adsorption des protéines à l'interface liquide/lipides dépend alors davantage de l'interaction électrostatique, qui se crée en sous-

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

phase. Ainsi, quand la pression initiale s'élève, les fragments interagissent plus avec les têtes polaires et la hauteur des particules s'élève.

En ce qui concerne l'Apo A-I, cette protéine crée une interaction électrostatique forte avec DPPG, qui est prépondérante devant son amphiphilicité. Cependant, contrairement aux trois fragments de la dystrophine, cette protéine s'insère dans la couche lipidique pour créer cette interaction électrostatique. Nous avons confirmé au cours de ce chapitre que la hauteur des objets présents dans la couche mixte Apo A-I/DPPG n'évolue pas lorsque la pression initiale de la couche devient plus forte. Ainsi, il semble que l'Apo A-I insère toujours les mêmes résidus dans la couche de lipides et que ceci lui est nécessaire pour interagir avec elle. Ce résultat semble également vrai pour DOPC. Nous avons de plus constaté que les particules insérées dans DPPG étaient de plus faibles hauteurs que les particules insérées dans DOPC, même après correction de la différence d'épaisseur des lipides. Ceci suggère que l'interaction électrostatique avec DPPG produit un rassemblement des résidus situés en sous-phase ou au dessus de la couche lipidique près des têtes polaires. L'absence de modifications visibles sur la hauteur des particules dans DPPG, lorsque la pression de départ diminue, démontre une fois de plus la prépondérance de l'interaction électrostatique sur l'amphiphilicité de cette protéine. En observant l'évolution de la hauteur au fur et à mesure que les surfaces des particules augmentent, nous avons ainsi caractérisé des tendances fines, qui sont peu visibles quand on regarde la distribution individuelle de chaque paramètre.

Nous avons établi un certain nombre de critères concernant l'interaction de l'Apo A-I avec les monocouches de lipides DPPC, DOPC et DPPG. Nous pouvons résumer cette interaction en deux tendances : une interaction avec les lipides zwitterioniques liée à l'amphiphilicité de la protéine, ce qui provoque une insertion plus importante de cette protéine dans la phase LE que dans la phase LC, et une interaction plus forte et principalement électrostatique avec DPPG, sans préférence de phase visible. Nous avons décidé d'étudier l'une de ces caractéristiques : la différence d'affinité entre les phases dans le lipide zwitterionique DPPC, sur une autre apolipoprotéine échangeable, Apo A-II.

Les mesures ellipsométriques et tensiométriques montrent que l'Apo A-II insère une partie de ces résidus dans la couche lipidique. Cependant, l'analyse de la forme des particules observées à l'AFM montre que ces objets ont en moyenne une hauteur, une surface et un périmètre plus grands avec cette protéine qu'avec la précédente apolipoprotéine, malgré un nombre de résidus dans sa structure qui est plus faible. Nous constatons également un accroissement rapide de la hauteur des particules en fonction de leur surface par rapport à ce qui est observé avec l'Apo A-I et R1-3 quand ces protéines sont insérées dans la couche de

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

lipides. Ainsi, nous constatons que l'Apo A-II n'insère qu'une faible partie de ses résidus entre les têtes polaires des lipides en phase LC, le reste de ces résidus étant expulsé vers la sous-phase ou au dessus de la partie hydrocarbonée. Le décalage de 1 nm de haut qui existe entre les distributions des hauteurs dans la phase LC et dans la phase LE, et qui correspond à la différence d'épaisseur entre les phases, laisse supposer que ces segments ne traversent pas la couche hydrocarbonée et dépassent vers le milieu aqueux. La comparaison de la forme des particules entre les deux phases, montre un aplatissement des objets dans la phase LE. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'éloignement des têtes polaires permettrait à la protéine de placer plus de résidus à l'interface hydrophile/hydrophobe, ce qui produirait une affinité plus forte de la protéine pour la phase LE que pour la phase LC. Une autre hypothèse consisterait en ce que les résidus expulsés de l'espace situé entre les têtes polaires créent des interactions avec les chaînes acyl des lipides, lorsque celles-ci sont orientées parallèlement entre elles dans la phase LC. Dans ce cas là, les segments de la protéine ne seraient pas orientés vers la sous-phase, mais vers la partie hydrocarbonée. Ce cas de figure impliquerait, contrairement à l'hypothèse précédente, une affinité plus forte de la protéine pour la phase LC que pour la phase LE. L'analyse statistique de la répartition spatiale des objets n'a pas permis de trancher en faveur de la préférence pour une phase ou pour une autre et nous indique que si celle-ci existe, alors le rapport entre les probabilités d'insertion dans chacune des phases est inférieur à cinq. Cependant, les mesures sur les images AFM montrent que l'Apo A-II s'insère en plus grande quantité dans la phase LC que l'Apo A-I, sans pour autant augmenter significativement la surpression par rapport à cette protéine. Cette constatation indique que l'interaction entre l'Apo A-II et le lipide est faible, et que l'énergie impliquée dans le changement de conformation de cette protéine et dans son interaction avec les lipides est également faible. Nous suggérons donc que cette apolipoprotéine s'adsorbe à l'interface liquide/lipides selon le même processus que l'Apo A-I, qui résulte en une déshydratation de la couche de lipides lors de l'insertion de la protéine. Comme l'Apo A-II n'insère qu'une faible quantité de résidus entre les têtes polaires de la phase LC, ceci explique que les surpressions puissent être proches. Ce mode d'interaction implique une insertion préférentielle dans la phase LE et rejette l'idée d'une interaction plus forte avec les lipides en phase LC.

Ces résultats sont en accord avec les travaux d'autres auteurs. Des études antérieures ont montré l'existence de deux transitions de phases du premier ordre sur l'isotherme de l'Apo A-II, lorsque celle-ci est adsorbée à l'interface liquide/air (12, 13). La première transition implique une coexistence entre une phase condensée L (liquide) et une phase de faible densité G (gazeuse). La seconde transition intervient pour une pression autour de

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

30~35 mN/m et implique deux états condensés : les phases L et LC (Liquide Condensé). Cette seconde transition est due à un changement de configuration, qui consiste en un redressement de deux hélices présentes dans le dimère (12). Par la suite, l'existence de ce changement de phase a été démontrée sur l'isotherme d'une couche mixte Apo A-II/DPPC adsorbée à la surface d'une cuve de Langmuir (14). Les images réalisées par microscopie à angle de Brewster (BAM) montrent, au cours de ce changement de phase, une modification de la réflectivité sur des domaines ressemblant beaucoup aux domaines lipidiques en phase LC, tandis que les zones pouvant être attribuées à la phase LE conservent leur réflectivité. Les auteurs avaient ainsi suggéré que l'Apo A-II en phase Liquide Condensé se mélangeait préférentiellement avec la phase LC du lipide (certaines hélices vont s'orienter dans la même direction que les chaînes acyl dans cette phase), tandis que la protéine en phase L (les hélices sont parallèles à l'interface) demeurerait dans l'autre phase du lipide (voir figure 15).

La distribution de la surface des particules produites par l'Apo A-II est en accord avec le modèle de formation des particules avec une étape de nucléation, qui a été décrit au chapitre 3. Ainsi, nous pouvons dire que l'Apo A-II crée beaucoup plus de noyaux dans la phase LC que l'Apo A-I (alors que la concentration en dimères d'Apo A-II en sous phase est la même que la concentration en monomères d'Apo A-I). L'absence d'interactions à longues distances entre les particules indique que les noyaux se créent dans la couche de lipides sans être influencés par la proximité des objets formés par les protéines autour d'eux. Ainsi, nous suggérons qu'une molécule d'Apo A-II (ou dimère) peut très probablement s'insérer avec plus de facilité qu'une molécule d'Apo A-I sur la surface d'une lipoprotéine où les têtes polaires sont proches. L'étude de la forme des particules créées par l'Apo A-II montre que leur hauteur augmente avec leur surface de façon proportionnelle. Ainsi, la présence d'interactions entre protéines permet de stabiliser les résidus expulsés du cœur de la couche, ce qui entraîne une augmentation progressive de la hauteur des particules au fur et à mesure que leur surface augmente. Nous en concluons qu'un dimère d'Apo A-II pourrait insérer les hélices les plus amphiphiles entre les têtes polaires des lipides et insérer les autres plus profondément dans la partie hydrophobe de la lipoprotéine. La profondeur de pénétration resterait tout de même faible en comparaison des hauteurs de près de 10 nm, observées pour les plus grandes particules.

**Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I
à celles d'autres protéines.**

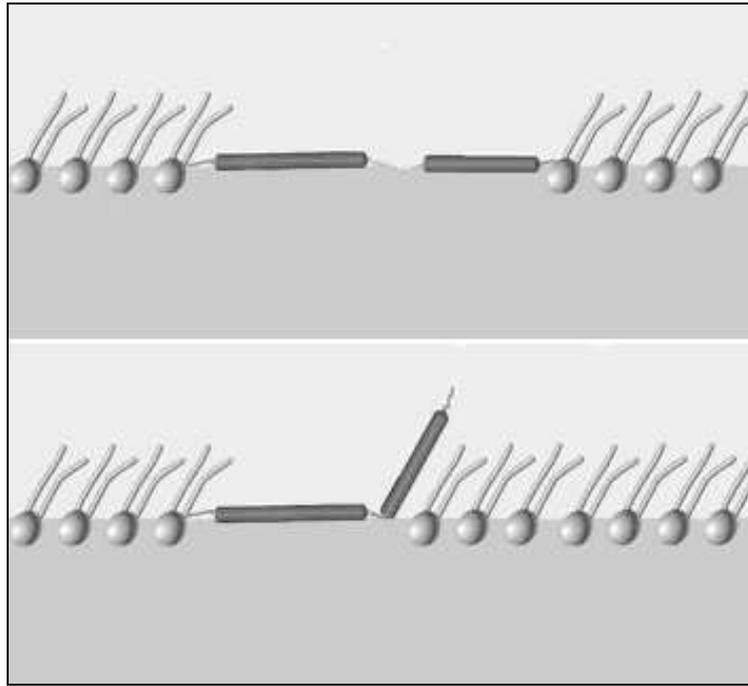


Figure 15 – Modèle proposé pour l'organisation de l'Apo C-I dans une couche de DPPC, les auteurs du modèle proposent une organisation semblable pour l'Apo A-II (14). En haut, le lipide est en phase LE, et en bas, en phase LC. Pour l'Apo A-II la protéine est sous forme de dimère. Dans ce cas là, deux hélices α quitteraient la surface pour s'orienter parallèlement aux chaînes lipidiques en phase LC.

Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I à celles d'autres protéines.

Bibliographie du chapitre 5

1. Ervasti JM. 2007. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. :1772(1772):1108-1717.
2. Koenig, M., and L. M. Kunkel. 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 265:4560-4566.
3. Winder, S. J., T. J. Gibson, and J. Kendrick-Jones. 1995. Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Letters* 369:27-33.
4. Rybakova, I. N., K. J. Amann, and J. M. Ervasti. 1996. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J. Cell Biol.* 135:661-672.
5. DeWolf C., M. P., Sikorski A.F., Winlove C.P., Bailey A.I., Kahana E., Pinder J.C., Gratzner W.B.. 1997. Interaction of dystrophin fragments with model membranes. *Biophys J.* :72(76):2599-2604.
6. Le Rumeur, E., Y. Fichou, S. Pottier, F. Gaboriau, C. Rondeau-Mouro, M. Vincent, J. Gallay, and A. Bondon. 2003. Interaction of Dystrophin Rod Domain with Membrane Phospholipids. EVIDENCE OF A CLOSE PROXIMITY BETWEEN TRYPTOPHAN RESIDUES AND LIPIDS. *J. Biol. Chem.* 278:5993-6001.
7. Legardinier, S., C. Raguénès-Nicol, C. Tascon, C. Rocher, S. Hardy, J.-F. Hubert, and E. Le Rumeur. 2009. Mapping of the Lipid-Binding and Stability Properties of the Central Rod Domain of Human Dystrophin. *Journal of Molecular Biology* 389:546-558.
8. Legardinier, S., J.-F. Hubert, O. L. Bihan, C. Tascon, C. Rocher, C. Raguénès-Nicol, A. Bondon, S. Hardy, and E. L. Rumeur. 2008. Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1784:672-682.
9. Vié V., Legardinier S., Chieze L., Le Bihan O., Qin Y., Hubert J-F., Renault A., Desbat B., Le Rumeur E. 2009. Adsorption behavior of two distinct dystrophin rod sub-domains using phospholipid Langmuir films studied by atomic force microscopy and PM-IRRAS. *Biophys. J* (Submitted).
10. Bottier, C., J. Géan, B. Desbat, A. Renault, D. Marion, and V. Vié. 2008. Structure and Orientation of Puroindolines into Wheat Galactolipid Monolayers. *Langmuir* 24:10901-10909.
11. Trudel, E., S. Beaufils, A. Renault, R. Breton, and C. Salesse. 2006. Binding of RPE65 Fragments to Lipid Monolayers and Identification of Its Partners by Glutathione S-Transferase Pull-Down Assays. *Biochemistry* 45:3337-3347.
12. Bolaños-García V.M., Ramos S., Castillo R., Xicohtencatl-Cortes J., and M.-O. J. 2001. Monolayers of Apolipoproteins at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem. B* 105 (24):5757 -5765.
13. Bolanos-Garcia V.M., Mas-Oliva J., Ramos S., and C. R. 1999. Phase Transitions in Monolayers of Human Apolipoprotein C-I. *J. Phys. Chem. B*:103, 6236-6242.
14. Xicohtencatl-Cortes J., Mas-Oliva J., and Castillo R. 2004. Phase Transitions of Phospholipid Monolayers Penetrated by Apolipoproteins. *J. Phys. Chem. B*:108, 7307-7315.

**Chapitre 5 – Comparaison des propriétés interfaciales de l'Apo A-I
à celles d'autres protéines.**

Conclusion générale

Nous avons étudié, sur cuve de Langmuir, les interactions entre une protéine : l'apolipoprotéine A-I (Apo A-I) et des phospholipides, en injectant cette protéine dans un milieu aqueux, sous une monocouche de phospholipides étalée à la surface de la cuve. Dans ces monocouches, les lipides peuvent exister dans deux phases : la phase liquide expansé (LE), où la densité du lipide est faible et où les chaînes acyl n'ont pas d'ordre dans leur orientation, et la phase liquide condensé (LC), où la densité du lipide est plus forte et où les chaînes acyl possèdent un ordre dans leur orientation. Nous avons étudié l'influence de la phase des lipides sur l'interaction protéines - lipides en observant le comportement de l'Apo A-I quand elle est injectée sous une couche de DPPC (coexistence de phases LE et LC) et sous une couche de DOPC (entièrement en phase LE). Nous avons également étudié l'influence de la charge portée par la tête polaire en comparant le comportement de l'Apo A-I sous une couche de DPPC (zwitterionique : +/-) et sous une couche de DPPG (anionique : -). Finalement, nous avons étudié l'influence de la phase des lipides sur une autre apolipoprotéine, l'Apo A-II. Pour cela, nous avons injecté cette protéine sous une couche de DPPC, à une pression où ce lipide montre une coexistence des phases LE et LC.

Nos résultats sur l'interaction de ces protéines avec les phospholipides s'articulent autour de trois grands axes :

- l'insertion et la surpression produites par les protéines dans chaque lipide,
- l'analyse de la forme des objets créés par ces protéines dans la couche de lipides, avec l'AFM, et l'étude de l'organisation des protéines au sein de ces objets par spectroscopie PM-IRRAS,
- la distribution spatiale des objets créés par les protéines sur les images AFM.

Nous allons maintenant développer ces trois points, puis nous enchaînerons sur les perspectives biologiques issues de ces résultats.

Conclusion générale

1- Etude de l'insertion et de la surpression réalisées par Apo A-I et A-II dans chaque lipide :

Les mesures effectuées par ellipsométrie et tensiométrie montrent que ces deux protéines interagissent avec les couches lipidiques en insérant une partie de leurs résidus entre les têtes polaires. Les mesures de l'angle ellipsométrique, de la tension de surface et de la surface qu'occupent les particules protéiques dans les couches lipidiques révèlent que l'Apo A-I s'insère en plus grande quantité à l'interface liquide/lipides et a une interaction plus forte pour DPPG que pour DOPC et DPPC. Ceci montre une interaction favorable avec les têtes polaires chargées négativement. Nous constatons également que l'insertion est plus importante dans la phase LE des lipides zwitterioniques que dans leur phase LC. Pourtant, malgré cette différence d'insertion, la surpression dans DOPC, qui est entièrement en phase LE, n'est pas significativement plus forte que celle produite dans DPPC, qui est majoritairement en phase LC. Dans les lipides zwitterioniques, l'augmentation de la pression de surface dépend donc faiblement du nombre de protéines insérées dans la couche. Ceci signifie que le changement conformationnel de la protéine et l'interaction protéines - lipides sont peu impliqués dans l'augmentation de la pression de surface et sont associés à une faible énergie.

Les mesures par AFM de la surface occupée par l'Apo A-II montrent que cette protéine a une surface d'occupation dans la phase LC de DPPC qui est plus importante que l'Apo A-I. Les mesures ellipsométriques et tensiométriques indiquent que cette protéine insère une partie de ces résidus dans la couche de DPPC. Cependant la surpression est à peu près équivalente à celle produite par l'Apo A-I. Cette constatation indique comme pour l'Apo A-I, que l'Apo A-II implique peu d'énergie dans son interaction avec les lipides et dans son changement conformationnel.

2- Analyse de la forme des objets créés par les protéines avec l'AFM et étude de la conformation et de l'orientation de l'Apo A-I par PM-IRRAS :

Les observations des couches mixtes protéines/lipides effectuées au microscope AFM montrent des objets formés par les protéines dont la hauteur varie entre 1 et 10 nm et dont le diamètre varie entre 15 et 100 nm. Le nombre de particules créées par l'Apo A-I et l'Apo A-II décroît avec l'augmentation de la hauteur, de la surface et du périmètre des particules créées par ces protéines.

Conclusion générale

Pour le cas de l'Apo A-I, cette décroissance s'effectue à peu près à la même vitesse pour chaque lipide. Cependant une influence de la charge a tout de même été mise en évidence, puisque nous constatons que les particules sont regroupées plus près des têtes polaires du lipide anionique que de celles des lipides zwitterioniques. Nous constatons que la forme des particules ne varie pas de façon significative lorsque la pression initiale des couches augmente et nous en déduisons que les segments insérés dans la couche de lipides sont probablement toujours les mêmes. Les mesures par spectroscopie PM-IRRAS indiquent que l'Apo A-I adopte une structure en hélices α dans DPPC, à l'intérieur des particules protéiques. Elles mettent également en évidence une modification de la conformation ou de l'orientation de la protéine dans DPPG, ce qui est en accord avec les mesures ellipsométriques montrant une forte différence entre ce lipide et les deux autres.

Nous avons comparé le comportement de l'Apo A-I à celui de fragments du domaine central de la dystrophine : R2, R1-3 et R20-24. Ces trois fragments ont la possibilité de créer une interaction électrostatique en sous-phase avec les têtes polaires des lipides. Ainsi, lorsque la compacité de la couche lipidique augmente, ces protéines interagissent plus fortement avec la couche, mais dans ce cas, le volume de résidus qu'elles insèrent entre les têtes polaires est plus faible. Nous observons alors avec l'AFM une élévation de la hauteur des particules. En revanche, nous constatons que l'Apo A-I semble ne pas avoir la possibilité de créer des interactions électrostatiques en sous-phase et nécessite d'insérer une partie de ces résidus dans la couche, ce qui a pour effet de diminuer son interaction avec DPPG lorsque la compacité du lipide augmente. Pour le cas de l'Apo A-II, l'analyse de la forme des particules observées à l'AFM montre que cette protéine augmente son taux d'occupation dans DPPC par rapport à l'Apo A-I, car elle peut se lier aux lipides en phase LC en insérant seulement une faible partie de ses résidus entre les têtes polaires. Cependant, lors de la diminution de la compacité et de l'éloignement des têtes polaires, la protéine pourrait placer plus de résidus à l'interface hydrophile/hydrophobe.

La distribution du nombre de particules en fonction de leur surface fut comparée à la distribution des surfaces obtenue selon un modèle classique d'auto-assemblage. Ce modèle comporte une étape de nucléation (insertion d'un monomère dans la couche de lipides) précédant la croissance des particules, qui s'effectue avec une constante de réaction k_2 indépendante de leur taille. Un bon accord est observé entre le modèle théorique et l'expérience pour les deux lipides testés : DOPC et DPPG. La constante de réaction k_2 de la croissance des particules est la même pour les deux lipides, ce qui implique que l'interaction entre les protéines n'est pas modifiée par l'influence de la phase ou de la charge. Ce modèle

Conclusion générale

d'auto-assemblage est également en accord avec la distribution de la surface des particules produites par l'Apo A-II dans DPPC.

3 – Analyse de la distribution spatiale des objets créés par les protéines sur les images AFM.

Nous avons comparé la distribution spatiale des particules à des distributions aléatoires de disques durs et de points. Nos résultats montrent que les particules protéiques sont formées préférentiellement dans la phase LE de DPPC et n'ont pas d'affinité particulière pour les domaines LC qui y sont présents, ni pour l'interface LE/LC. Nous confirmons ainsi la préférence de la protéine pour la phase LE. En revanche, dans DPPG, la distribution des objets est proche de celle trouvée dans DOPC, ainsi aucune influence de la phase n'a été constatée malgré la présence de coexistence LE/LC. L'interaction électrostatique avec DPPG permet donc à la protéine de s'insérer dans la phase LC. Ces résultats montrent également l'absence d'interactions à longues distances entre les particules, quelque soit le lipide considéré. Les seules interactions mises en évidence semblent être d'origine stérique. L'étude de la distribution spatiale des objets créés par l'Apo A-II sur les images AFM ont établi que la préférence pour une phase, si elle existe, était clairement moins forte pour l'Apo A-II que pour l'Apo A-I. Elles ont également mis en évidence l'absence d'interactions à longues distances entre les objets créés par cette protéine.

Dans le cas de l'Apo A-I, la constante k_2 de la croissance des particules est la même pour les trois lipides, la différence d'occupation entre chaque lipide et chaque phase dépend donc uniquement du nombre de noyaux qui s'y sont formés. L'absence d'interactions à longues distances implique que les noyaux se forment indépendamment de la présence d'objets créés par la protéine autour d'eux. Nous en concluons que les différences d'affinité de l'Apo A-I entre les phases et les charges des lipides existent toujours à l'échelle des lipoprotéines et que l'influence de la charge domine encore l'influence de la phase à cette échelle. Dans le cas de l'Apo A-II, nous concluons que la capacité de cette protéine à adapter le nombre de résidus insérés entre les têtes polaires à l'espace situé entre elles doit également exister à l'échelle des lipoprotéines.

Conclusion générale

Perspectives biologiques.

Les expériences menées par Derksen et co-auteurs sur des émulsions DPPC/Trioléine (avec une faible proportion de cholestérol) montrent que l'Apo A-I s'insère dans la couche lipidique afin de créer un changement conformationnel lui permettant d'augmenter la proportion d'hélices α dans sa structure (et de stabiliser ainsi davantage les résidus hydrophobes) (1). Ce comportement a été observé par d'autres auteurs sur l'Apo A-I (2) et semble être un comportement général des apolipoprotéines (3). Cependant, Derksen et co-auteurs ont également mis en évidence que ce changement conformationnel n'était plus visible lorsque DPPC est en phase LE. Ceci peut s'expliquer par le fait que la compacité du lipide est plus faible, et que les résidus hydrophobes sont trop accessibles aux molécules d'eau pour passer dans une structure en hélices α . Le changement conformationnel de la protéine s'effectue dans ce cas, uniquement si la protéine est entourée de lipides en phase LC. L'insertion de la protéine dans la couche de lipides en phase LE est alors réalisée, car elle permet de libérer les molécules d'eau emprisonnées entre les têtes polaires, ce qui réalise pour elles un gain d'entropie.

Nous avons conclu précédemment que l'Apo A-I n'interagit pas avec la phase LC, mais uniquement avec la phase LE, et que son insertion dans la couche de lipides n'implique pas d'énergie importante dans son changement conformationnel et dans son interaction avec le lipide. Nous en déduisons d'une part que l'Apo A-I s'insère à l'interface liquide/DPPC en déshydratant la couche de lipides, d'autre part que c'est l'absence de matière hydrophobe au dessus de la couche de lipides qui empêche l'Apo A-I de réaliser un changement conformationnel et de s'insérer profondément dans la phase LC. Cette hypothèse est en accord avec les résultats d'autres auteurs qui ont montré sur des complexes constitués d'Apo A-I, de phospholipides et d'ester de cholestérol, que la conformation en hélices α et la stabilité de l'Apo A-I étaient favorisées par la présence des esters de cholestérol au centre du complexe (4-6). Ce qui suggère que les segments hélicoïdaux de l'Apo A-I sont stabilisés par des interactions avec les esters de cholestérol (6).

Sparks et co-auteurs ont montré que la LCAT possédait une plus forte vélocité dans l'estérification du cholestérol avec les particules dont la stabilité et le taux d'hélices α étaient faibles (7). Comme le cholestérol estérifié augmente le nombre d'hélices dans la structure de l'Apo A-I et les stabilise, ces auteurs suggèrent que ce type de particules soit thermodynamiquement favorable à l'accumulation d'ester de cholestérol. Ainsi, nous suggérons que le modèle d'interaction de l'Apo A-I avec la couche lipidique que nous avons

Conclusion générale

observé à l'interface liquide/lipides, soit plus proche des particules thermodynamiquement instables que des autres particules. Dans ce cas, la configuration de l'Apo A-I telle que nous l'avons caractérisé serait proche de sa configuration lorsqu'elle active la LCAT.

Palgunachari et co-auteurs ont étudié l'interaction de peptides synthétiques correspondant à des fragments de l'Apo A-I de 22 acides aminés de long, avec une monocouche de PC (egg PC) (8). Ils montrent ainsi que les segments comprenant les résidus 44 à 65 et 220 à 241 possèdent des pressions d'exclusion respectivement de 30 mN/m et 28 mN/m, qui sont plus fortes que celles des autres segments. Ceci indique que les segments non insérés entre les têtes polaires de DOPC sont probablement ceux compris entre les résidus 66 et 187 de l'Apo A-I. Ainsi, la partie centrale permettant d'activer la LCAT, n'est pas insérée entre les têtes polaires.

Revenons maintenant aux expériences réalisées par Derksen et co-auteurs (1). Nous avons indiqué que l'espacement entre les têtes polaires en phase LE empêche l'Apo A-I de transformer ses résidus non structurés en hélice α , car les résidus hydrophobes seraient alors trop exposés aux molécules d'eau. Cependant, si comme nous le suggérons, le caractère entropique de l'interaction entre l'Apo A-I et la phase LE de DPPC dans les émulsions correspond également au comportement de l'Apo A-I dans la phase LE de la monocouche de DPPC, ceci laisse supposer que les résidus non insérés entre les têtes polaires ne peuvent pas se situer au dessus de la partie hydrocarbonée de notre monocouche de lipides. En effet, dans ce cas l'Apo A-I pourrait s'insérer profondément dans le matériau hydrophobe de l'émulsion et ainsi interagir avec celui-ci, même si les phospholipides, à la surface, sont en phase LE. Nous en concluons que les segments non insérés dans la couche de lipides se situent dans la sous-phase. Ainsi, lors de son insertion dans une monocouche de PC située à l'interface liquide/air, l'Apo A-I exposerait fortement au milieu aqueux son domaine central, responsable de l'activation de la LCAT, ces segments seraient ainsi plus accessibles à l'enzyme.

Franck P.G. et Marcel Y.L. ont mentionné que le mécanisme d'activation de la LCAT par l'Apo A-I pourrait impliquer une interaction directe entre des résidus chargés négativement situés sur une hélice de la LCAT (comprise entre les résidus 152 et 169) et des résidus chargés positivement situés sur le domaine central de l'Apo A-I (appartenant aux hélices comprises entre les résidus 144 à 165 et/ou 166 à 186) (9). Or nous avons montré que les hauteurs des particules formées par l'Apo A-I sont globalement plus faibles en présence du lipide anionique DPPG. Ceci indique que les segments les plus éloignés des têtes polaires dans les lipides zwitterioniques ont une interaction électrostatique favorable avec les charges négatives, ce qui renforce l'hypothèse que ces segments soient ceux qui activent la LCAT.

Conclusion générale

Ainsi, dans le cadre d'un complexe thermodynamiquement instable, les segments du domaine central qui sont supposés être responsables de l'activation de la LCAT, seraient en dehors de la couche lipidique, dans la sous-phase. Dans nos expériences, nous avons constaté que DPPG, qui a une tête polaire anionique, permet à l'Apo A-I de s'insérer dans les domaines en phase LC, alors que DPPC, qui a une tête polaire zwitterionique, ne le permet pas. La LCAT pourrait donc stabiliser l'Apo A-I à la surface des HDL en créant des interactions électrostatiques avec elle. Nous renforçons de cette manière l'hypothèse formulée précédemment par Sparks et co-auteurs (7), qui suppose une action stabilisatrice de la LCAT sur certains HDL, lorsque la protéine a un faible taux d'hélices dans sa structure. Nous pouvons également imaginer que des interactions électrostatiques permettraient à d'autres protéines ou à une autre membrane lipidique d'enlever l'Apo A-I de la surface du complexe.

Plusieurs études ont mis en évidence le déplacement de l'Apo A-I par l'Apo A-II (10, 11) à la surface des HDL. Cependant, nos résultats montrent qu'à l'interface liquide/DPPC, l'Apo A-II ne crée pas d'interactions plus fortes avec les lipides que l'Apo A-I. Ceci suggère qu'en l'absence de changement conformationnel, l'Apo A-II ne peut pas assurer le déplacement de l'Apo A-I de l'interface liquide/lipide. Les auteurs de ces études ont formulé l'hypothèse que l'Apo A-II pourrait inhiber la réaction d'estérification de la LCAT en déplaçant l'Apo A-I de la surface des HDL (10, 11). Si nous conservons l'hypothèse que les monocouches de lipides puissent modéliser la surface des HDL instables thermodynamiquement, et qui par cela même, privilégieraient l'interaction avec la LCAT, alors nous constatons deux choses. Premièrement, dans cette situation, l'Apo A-II ne déplacerait pas l'Apo A-I de la surface des HDL, puisqu'elle ne permettrait pas d'abaisser la tension superficielle de la membrane. Deuxièmement, en adaptant la quantité de résidus à l'espace situé entre les têtes polaires des lipides, comme elle le fait pour s'insérer dans la phase LE et la phase LC, l'Apo A-II aurait ainsi la possibilité de maintenir la pression à la surface de la lipoprotéine, au fur et à mesure que la LCAT créerait une déplétion en transformant le cholestérol libre en ester de cholestérol et les phospholipides en lysophospholipides. Dans cette situation, l'Apo A-II n'inhiberait pas l'action de la LCAT, mais au contraire, la faciliterait.

Il existe un consensus sur le fait que le changement de conformation transformant les segments non structurés des apolipoprotéines en hélices α soit le principal mécanisme de liaison des apolipoprotéines aux lipides (9, 12, 13). Cependant, nous constatons que la liaison de deux apolipoprotéines : Apo A-I et Apo A-II à des membranes lipidiques n'implique pas

Conclusion générale

forcément de changement conformationnel important. Dans cette situation, les deux protéines s'insèrent à l'interface liquide/DPPC jusqu'à une pression à peu près semblable dans les deux cas. Ce comportement similaire est à rapprocher du comportement des apolipoprotéines à l'interface liquide/air observé par Bolanos-Garcia et co-auteurs (14). Ils ont mis en évidence pour cinq apolipoprotéines échangeables (A-I, A-II, C-I, C-II et C-III), que les couches formées à l'interface liquide/air possèdent des concentrations surfaciques proches et des pressions finales d'adsorption proches (voir chapitre 1 section 2.2). Ceci semble indiquer des amphiphilicités similaires pour les répétitions du motif 11-mer constituant ces protéines.

Ainsi lors de leurs interactions avec les lipides, ces protéines pourraient présenter deux structures différentes. La première, conduit à une faible affinité pour les lipides. Cette affinité pourrait être globalement identique pour toutes ces protéines, comme nous l'observons pour l'Apo A-I et l'Apo A-II sur une monocouche de Langmuir. L'affinité pour les lipides serait alors directement liée à l'amphiphilicité des motifs 11 mers. La seconde structure augmenterait très fortement l'affinité des segments de protéines pour les lipides, en permettant notamment la liaison de l'Apo A-I avec la phase LC du DPPC. Elle permettrait également de créer une différence d'affinité entre ces protéines, comme le suggère la situation où Apo A-II peut déplacer Apo A-I. Cette structure impose, pour se former, de pouvoir isoler certains résidus des molécules d'eau et de créer des interactions stabilisatrices avec la partie hydrophobe des lipides. Ainsi, les apolipoprotéines échangeables n'optent probablement pas pour cette deuxième configuration lors de leur interaction avec une monocouche de phospholipides déposée à l'interface liquide/air, car l'épaisseur de la partie hydrophobe de la couche lipidique est trop faible. Nous suggérons que ces deux types d'interactions (interaction faible et interaction forte avec changement de conformation) peuvent être impliquées dans les fonctions biologiques des apolipoprotéines échangeables.

Conclusion générale

Bibliographie de la conclusion générale

1. Derksen, A., D. Gantz, and D. M. Small. 1996. *Calorimetry of apolipoprotein-A1 binding to phosphatidylcholine-triolein-cholesterol emulsions. Biophys. J.* 70:330-338.
2. Arnulphi, C., L. Jin, M. A. Tricerri, and A. Jonas. 2004. *Enthalpy-Driven Apolipoprotein A-I and Lipid Bilayer Interaction Indicating Protein Penetration upon Lipid Binding* *Biochemistry* 43:12258-12264.
3. Saito H., Lund-Katz S., and Phillips M.C. 2004. *Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins (Review). Progress in Lipid Research* 43:350–380.
4. Lux, S. E., R. Hirz, R. I. Shrager, and A. M. Gotto. 1972. *The Influence of Lipid on the Conformation of Human Plasma High Density Apolipoproteins. J. Biol. Chem.* 247:2598-2606.
5. Sparks, D. L., W. S. Davidson, S. Lund-Katz, and M. C. Phillips. 1995. *Effects of the Neutral Lipid Content of High Density Lipoprotein on Apolipoprotein A-I Structure and Particle Stability. J. Biol. Chem.* 270:26910-26917.
6. Jonas, A., J. H. Wald, K. L. Toohill, E. S. Krul, and K. E. Kezdy. 1990. *Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. J. Biol. Chem.* 265:22123-22129.
7. Sparks, D. L., P. G. Frank, and T. A. M. Neville. 1998. *Effect of the surface lipid composition of reconstituted LPA-I on apolipoprotein A-I structure and lecithin:cholesterol acyltransferase activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1390:160-172.
8. Palgunachari M.N., Mishra V.K., Lund-Katz S., Phillips M.C., Adeyeye S.O., Alluri S., Anantharamaiah G.M., and Segrest J.P. 1996. *Only the Two End Helices of Eight Tandem Amphipathic Helical Domains of Human Apo A-I Have Significant Lipid Affinity : Implications for HDL Assembly. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:328-338.
9. Franck, P. G., and Y. L. Marcel. 2000. *Apolipoprotein A1 : Structure-Fonction Relationship.* 41:853-872.
10. Durbin, D. M., and A. Jonas. 1997. *The Effect of Apolipoprotein A-II on the Structure and Function of Apolipoprotein A-I in a Homogeneous Reconstituted High Density Lipoprotein Particle. J. Biol. Chem.* 272:31333-31339.
11. Lagocki, P. A., and A. M. Scanu. 1980. *In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein. Displacement of apolipoprotein A-I from high density lipoprotein by apolipoprotein A-II. J. Biol. Chem.* 255:3701-3706.
12. Saito, H., P. Dhanasekaran, D. Nguyen, E. Deridder, P. Holvoet, S. Lund-Katz, and M. C. Phillips. 2004. *{alpha}-Helix Formation Is Required for High Affinity Binding of Human Apolipoprotein A-I to Lipids. J. Biol. Chem.* 279:20974-20981.
13. Segrest, J. P., R. L. Jackson, J. D. Morrisett, and A. M. Gotto. 1974. *A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. FEBS Letters* 38:247-253.

Conclusion générale

14. *Bolanos-Garcia, V. M., A. Renault, and S. Beaufils. 2008. Surface Rheology and Adsorption Kinetics Reveal the Relative Amphiphilicity, Interfacial Activity, and Stability of Human Exchangeable Apolipoproteins. Biophys J. 94:1735-1745.*

ANNEXE 1 : protocole expérimental pour l'expression et la purification de l'Apo A-I (même protocole pour l'Apo A-II)

Recombinant Apo A-I was expressed in *E. coli* Rosetta 2 at 37°C, 250 rpm in 2xTY broth. When cell density of 0.6-0.8 at OD600 nm was reached, cells were induced with IPTG. Inclusion bodies were resuspended in denaturing buffer (i.e., Tris buffer 10 mM containing 8 M urea, 25 mM imidazole, and 5 mM beta-mercaptoethanol, pH 8.0). The resulting solution was loaded onto one chromatographic column packed with Ni-NTA agarose previously equilibrated in the same buffer solution. After being washed with at least 20 column volumes, recombinant Apo A-I was refolded by quick dilution in TBS buffer containing 1M arginine, and concentrated using vivaspin centrifuge tubes. Refolded Apo A-I was subjected to thrombin cleavage after extensive dialysis in TBS. One unit of thrombin protease of high purity was used to digest 1 mg of recombinant Apo A-I for 6-8 hrs at 4°C. Thrombin and the cleaved histidine tag were removed using a benzamidine fast flow column and a Ni-NTA column, respectively, previously equilibrated in TBS. As the final purification step, Apo A-I was loaded onto a gel filtration column (Superdex 75, HR 26/60), and eluted in 20 mM Tris buffer, 200 mM NaCl, pH 8.0 (TBS buffer) at 1 ml/min. After analysis by SDS-PAGE and measurement of UV absorption spectra (200–300 nm), fractions containing pure Apo A-I were collected and concentrated. Pure recombinant Apo A-I was concentrated fivefold and stored at -20°C. N-terminal sequence and mass spectrometry were carried out to confirm protein identity and purity of recombinant Apo A-I.

ANNEXE 2 : programme ImageJ pour réaliser des histogrammes sur la hauteur, le périmètre et la surface des objets sur une série d'images AFM

```
// Cette macro ne prend en compte que les objets de surface < L pixels.

//Paramètres à changer pour passer d'un jeu d'images à un autre.
seuil=140;
zrange=30;
nslices=8;
FOV=8; //Taille de l'image utilisée en µm
L=200*(8*8)/(FOV*FOV); //Limite sur la surface des particules.
dim=512;

////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////

// Cette fois on ouvre une séquence d'images directement en NdG 8 bits
//A MODIFIER SI CHANGEMENT DE REPERTOIRE de
//TRAVAIL!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
run("Image Sequence...", "open=C:\\Analyses-AFM\\dppc_15A1000_8µm_z30g.TIF
number=100 starting=1 increment=1 scale=100 file=[] or=[] convert sort");

// On passe en Niveaux de gris
//run("8-bit");

// On binarise l'image
//run("Threshold...");
setThreshold(seuil, 255);
run("Convert to Mask");

// On passe en pixel
run("Set Scale...", "distance=33 known=1 pixel=1.3 unit=pixel");

//Pour chaque particule on mesure la position du centre (x,y) et la surface
// Pour un fichier ou une séquence différente il faut aussi changer le "Set Measurements"
// On modifie le Set Measurements pour obtenir le numéro de la Slice.
//A MODIFIER SI CHANGEMENT DE REPERTOIRE de
//TRAVAIL!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
run("Set Measurements...", "area centroid perimeter slice redirect=Analyses-AFM
decimal=3");

run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing display
summarize stack");

//On introduit ces valeurs dans 3 tableaux.
tabA=newArray(nResults);
tabX=newArray(nResults);
tabY=newArray(nResults);
tabPerim=newArray(nResults);
```

```

tabSlices=newArray(nResults);

max=newArray(nResults);

// on initialise le tableau des maximums.
for(i=0;i<nResults;i++) {
max[i]=0;
}
// On initialise la surface totale occupée à 0.
aire =0;
perim = 0;

//Début de la boucle sur chaque particule
for(i=0;i<nResults;i++) {

//On applique une condition sur la taille des particules.
    surf=getResult("Area",i);
    if(surf<L){
        tabA[i] =surf;
        tabPerim[i] = getResult("Perim.",i);
    }
    else {
        tabA[i]=0;
        tabPerim[i] = 0;
    }
    aire=aire+tabA[i];
    perim=perim+tabPerim[i];

    tabX[i] = getResult("X",i);
    tabY[i] = getResult("Y",i);

    tabSlices[i] = getResult("Slice",i);
}

write("Surface Occupée Moyenne(par image)");
write(aire/(nslices*dim*dim));
write("-----");
write("Interface Agrégat-Lipide(par image)");
write(perim/(nslices));
write("-----");
write("Limite sur la Surface des Agrégats");
write (L);

```

```

//On ré-ouvre la séquence d'images directement en NdG 8 bits
//A MODIFIER SI CHANGEMENT DE REPERTOIRE de
//TRAVAIL!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
run("Image Sequence...", "open=C:\\Analyses-AFM\\dppc_15A1000_8µm_z30g.TIF
number=100 starting=1 increment=1 scale=100 file=[] or=[] convert sort");

// On passe en pixel
run("Set Scale...", "distance=33 known=1 pixel=1.3 unit=pixel");

////////////////////////////////////
// On créé les histogrammes sur la hauteur et la surface des particules.

NbinsH=256;
//la résolution en hauteur dépend exclusivement du nombre de niveaux de gris..

NbinsA=30*30;
//On prend une résolution de 1 pixel, et on ne s'intéresse pas aux particules de plus de 30*30
//pixels.

NbinsP=300;
//On prend une résolution de 1 pixel sur le périmètre, et on ne s'intéresse pas aux particules
//d'un périmètre de plus de 100 pixels

HistArea=newArray(NbinsA);
HistHauteur=newArray(NbinsH);
HistPerim=newArray(NbinsP);

// On initialise les tableaux.
    for (n=0;n<NbinsA;n++){
        HistArea[n]=0;
    }
    for (n=0;n<NbinsH;n++){
        HistHauteur[n]=0;
    }
    for (n=0;n<NbinsP;n++){
        HistPerim[n]=0;
    }
//L'image de départ est la slice N°1
a=1;

```

```

/////////////////////////////////////////////////////////////////
//ON CONSTRUIT UNE BOUCLE SUR LES PARTICULES.
//Pour chaque particule on construit le rectangle dans lequel on va rechercher le max.
for(i=0;i<nResults;i++) {

// On regarde l'image contenant la particule i.

if (a !=tabSlices[i]){
    a=tabSlices[i];
    setSlice(a);
}
x=tabX[i]-sqrt(tabA[i])/2;
y=tabY[i]-sqrt(tabA[i])/2;
dx=sqrt(tabA[i]);
dy=sqrt(tabA[i]);

//On réalise une boucle sur les pixels de la particule.
for (j=0;j<dx;j++){
    for (k=0;k<dy;k++){
        if(getPixel(x+j, y+k)>max[i]){
            max[i]=getPixel(x+j, y+k);
        }
    }
}

/////////////////////////////////////////////////////////////////
//Histogramme Hauteur
//On place la valeur du max dans l'histogramme.
for (k=0;k<NbinsH;k++){
    if(k<=max[i]){
        num1=k;
    }
}

//Seulement si la surface de la particule i est inférieure à L pixels.
if(tabA[i] !=0){
    HistHauteur[num1]=HistHauteur[num1]+1;
}

//Histogramme Surface
for (k=0;k<NbinsA;k++){
    if(k<=tabA[i]){
        num2=k;
    }
}
HistArea[num2]=HistArea[num2]+1;

```

```

//Histogramme Perimètre
    for (k=0;k<NbinsP;k++){
        if(k<=tabPerim[i]){
            num3=k;
        }
    }

//Seulement si la surface de la particule i est inférieure à L pixels.
if(tabA[i] !=0){
    HistPerim[num3]=HistPerim[num3]+1;
}
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////

//print(i,max[i],(max[i]*zrange/256)-zrange/2);
}
//FIN DE LA BOUCLE SUR LES PARTICULES

// On final, on réalise 2 nouvelles boucles pour écrire les histogrammes dans le fichier.
print("Surface(µm²)", " ", "Surface(pixel)", " ", "Count-Stat(Count/", nslices, ")", " ",
      ", Count-Norm(Count/", nResults, ")", " ", "Count-Surface");
for (k=0;k<NbinsA;k++){
    print(k*FOV*FOV/(dim*dim), " ", k*1, " ", HistArea[k]/nslices, " ",
          ", HistArea[k]/nResults, " ", HistArea[k]);
}

print("++++");
print("Perim.(µm)", " ", "Perimètre(pixel)", " ", "Count-Stat(Count/", nslices, ")", " ", "Count-
Norm(Count/", nResults, ")", " ", "Count-Perim");
for (k=0;k<NbinsP;k++){
    print(k*FOV/dim, " ", k*1, " ", HistPerim[k]/nslices, " ", HistPerim[k]/nResults, " ",
          ", HistPerim[k]);
}

print("*****");
print("NdG", " ", "Hauteur(nm)", " ", "Count-Stat(Count/", nslices, ")", " ", "Count-
Norm(Count/", nResults, ")", " ", "Count");
for (k=0;k<NbinsH;k++){
    print(k, " ", ((k*zrange/256)-zrange/2), " ", HistHauteur[k]/nslices, " ",
          ", HistHauteur[k]/nResults, " ", HistHauteur[k]);
}

```

ANNEXE 3 : programme ImageJ pour réaliser des graphes de la hauteur des objets en fonction de leur surface sur une série d'images AFM

```
//Nouvelle macro pour calculer la hauteur des objets insérés.
//Paramètres à changer pour passer d'un jeu d'images à un autre.

seuil=149;
zrange=30;
nslices=13;
FOV=8;

////////////////////////////////////
// Cette fois on ouvre une séquence d'images directement en NdG 8 bits

//A MODIFIER SI CHANGEMENT DE REPERTOIRE de
//TRAVAIL!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

run("Image Sequence...", "open=C:\\Analyses-AFM\\dppc_15A1000_8µm_z30g.TIF
number=100 starting=1 increment=1 scale=100 file=[] or=[] convert sort");
setAutoThreshold();

// On passe en Niveaux de gris
//run("8-bit");

// On binarise l'image
//run("Threshold...");
setThreshold(seuil, 255);
run("Convert to Mask");

// On passe en pixel
run("Set Scale...", "distance=33 known=1 pixel=1.3 unit=pixel");

//Pour chaque particule on mesure la position du centre (x,y), la surface et le PERIMETRE.
//et on affiche le numéro de la Slice.
//A MODIFIER SI CHANGEMENT DE REPERTOIRE de
//TRAVAIL!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
run("Set Measurements...", "area centroid perimeter slice redirect=Analyses-AFM
decimal=3");

run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing display
summarize stack");

//On introduit ces valeurs dans 3 tableaux.
tabA=newArray(nResults);
tabX=newArray(nResults);
tabY=newArray(nResults);
tabPerim=newArray(nResults);
```

```

//Ce tableau contient la référence à l'image de la particule.
tabSlices=newArray(nResults);

//Ce tableau contient le maximum des NdG de chaque particule.
max=newArray(nResults);

// on initialise le tableau des maximums.
for(i=0;i<nResults;i++) {
max[i]=0;
}
// On initialise la surface totale occupée à 0.
aire =0
//Debut de la boucle sur chaque particule
for(i=0;i<nResults;i++) {
tabA[i] = getResult("Area",i);
aire=aire+tabA[i];
tabX[i] = getResult("X",i);
tabY[i] = getResult("Y",i);
tabPerim[i] = getResult("Perim.",i);

tabSlices[i] = getResult("Slice",i);

}
//Ici il n'y a pas de limite sur la taille des agrégats que l'on prend en compte
write("Surface Occupée Moyenne(par image)");
write(aire/(nslices*512*512));

//On ré-ouvre l'image en niveaux de gris
//open("D:\\Lionel\\Manip_Salle_LB\\Sauvegarde\\W_imageJ\\dopc+A1 30\\Z-
30\\A1011\\dopc2_30A1011_8µm_z30.TIF");
//run("8-bit");

//On ré-ouvre la séquence d'images directement en NdG 8 bits
//A MODIFIER SI CHANGEMENT DE REPERTOIRE de
//TRAVAIL!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
run("Image Sequence...", "open=C:\\Analyses-AFM\\dppc_15A1000_8µm_z30g.TIF
number=100 starting=1 increment=1 scale=100 file=[] or=[] convert sort");

// On passe en pixel
run("Set Scale...", "distance=33 known=1 pixel=1.3 unit=pixel");

//L'image de départ est la slice N°1
a=1;

```

```

//Pour chaque particule on construit le rectangle dans lequel on va rechercher le max.

print("Particule", "      ", "Surface(pixel)", "      ", "Surface( $\mu\text{m}^2$ )", "      ", "perim(pixel)", "      ",
      ", "perim( $\mu\text{m}$ )", "      ", "NdG", "      ", "Hauteur(nm)", "      ", "Slice");
for(i=0;i<nResults;i++) {

// On regarde l'image contenant la particule i.
if (a !=tabSlices[i]){
    a=tabSlices[i];
    setSlice(a);
}

x=tabX[i]-sqrt(tabA[i])/2;
y=tabY[i]-sqrt(tabA[i])/2;
dx=sqrt(tabA[i]);
dy=sqrt(tabA[i]);

//On réalise une boucle sur les pixels de la particule.
for (j=0;j<dx;j++){
    for (k=0;k<dy;k++){
        if(getPixel(x+j, y+k)>max[i]){
            max[i]=getPixel(x+j, y+k);
        }
    }
}

//On écrit les résultats dans le fichier log
print(i, "      ", tabA[i], "      ", tabA[i]*FOV*FOV/(512*512), "      ", tabPerim[i], "
      ", tabPerim[i]*FOV/(512), "      ", max[i], "      ", (max[i]*zrange/256)-zrange/2, "
      ", tabSlices[i]);

}

```

ANNEXE 4 : images AFM des couches mixtes Apo A-I / phospholipides et Apo A-II / phospholipides.

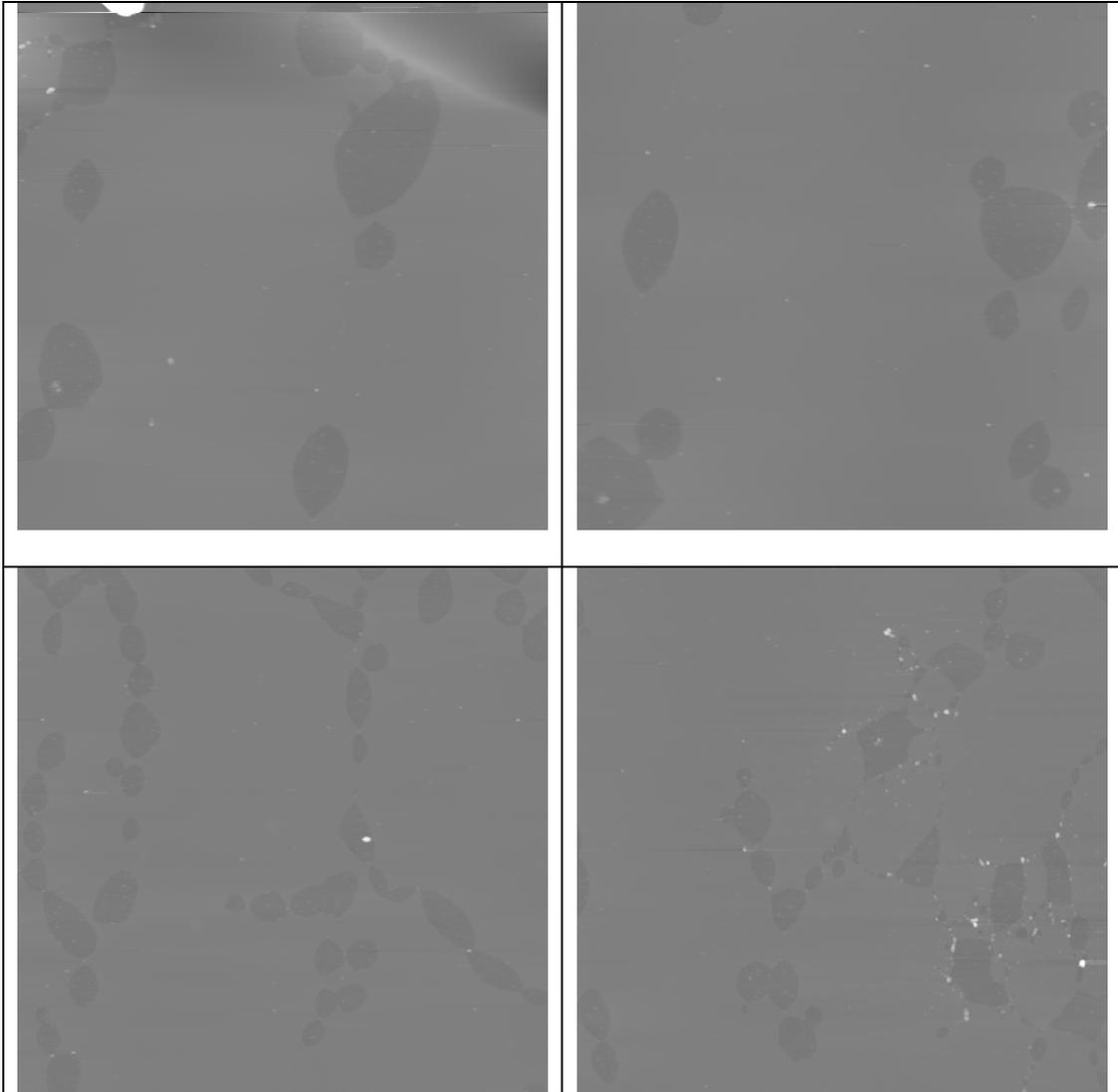


Figure 1 – images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) en NDG du prélèvement L-B d'une couche mixte Apo A-I / DPPC, avec une pression initiale de 15 mN/m. Sur ces images les hauteurs peuvent varier de -15 nm à +15 nm (z -range = 30 nm pour 256 NDG), ce qui nous donne une résolution sur la hauteur des particules d'environ 0.12 nm. Cette résolution verticale fut utilisée pour nos analyses.

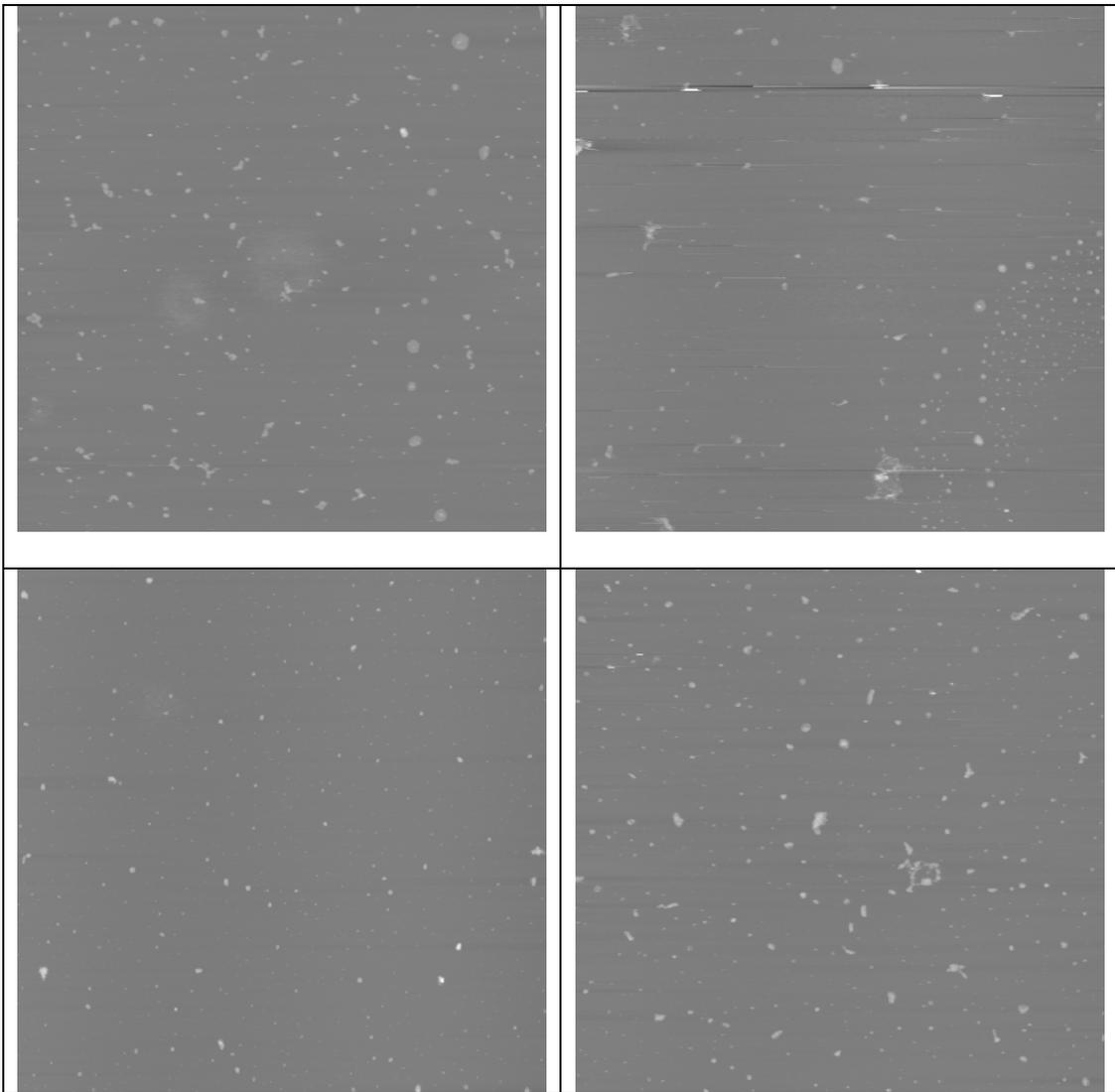


Figure 2 – images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) en NDG du prélèvement L-B d'une couche mixte Apo A-I / DOPC, avec une pression initiale de 15 mN/m. Sur ces images la résolution sur la hauteur des particules est d'environ 0.12 nm. Cette résolution fut utilisée pour nos analyses.

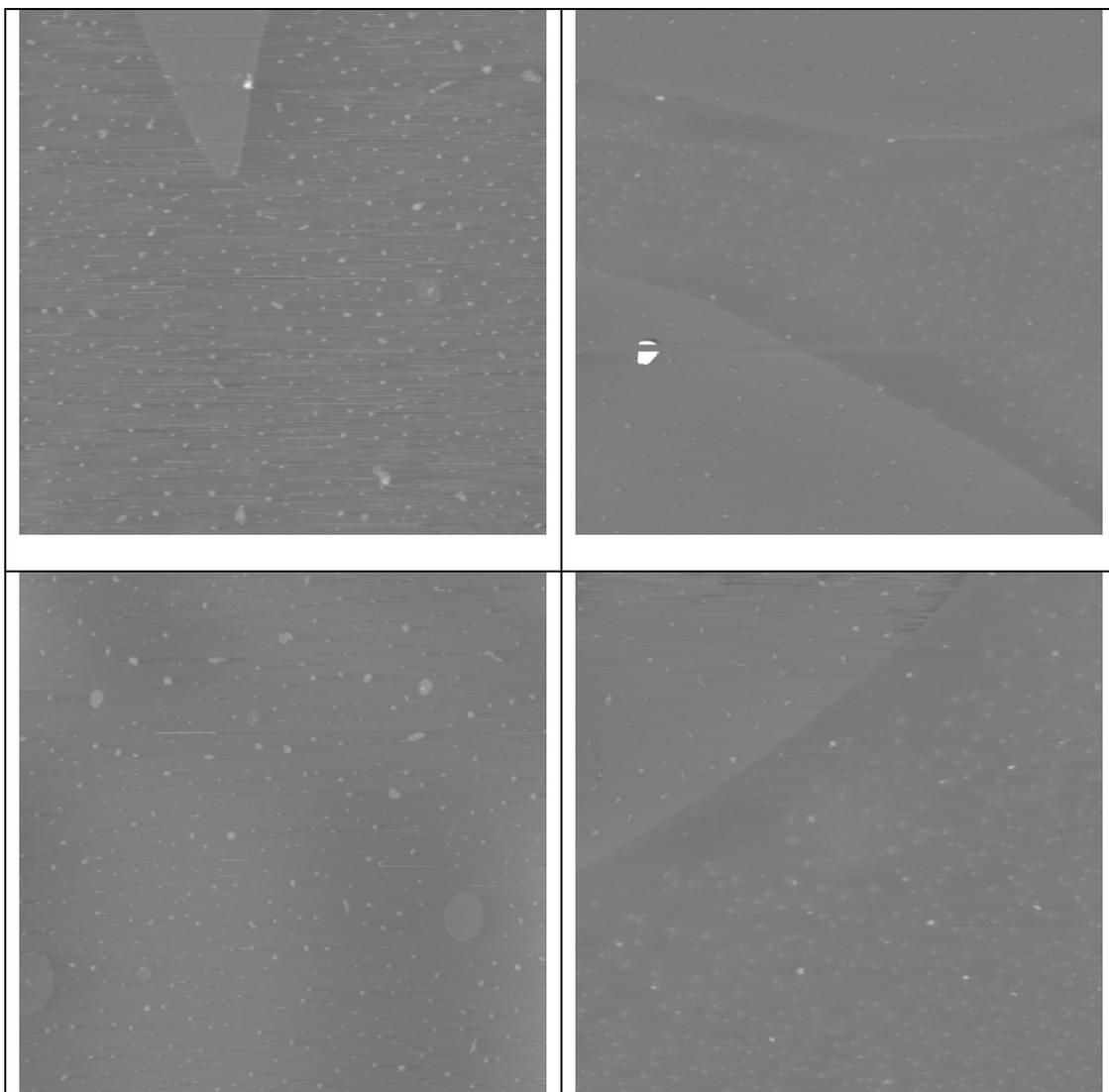


Figure 3 – images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) en NDG du prélèvement L-B d'une couche mixte Apo A-I / DPPG, avec une pression initiale de 15 mN/m. Sur ces images la résolution sur la hauteur des particules est d'environ 0.12 nm. Cette résolution fut utilisée pour nos analyses.

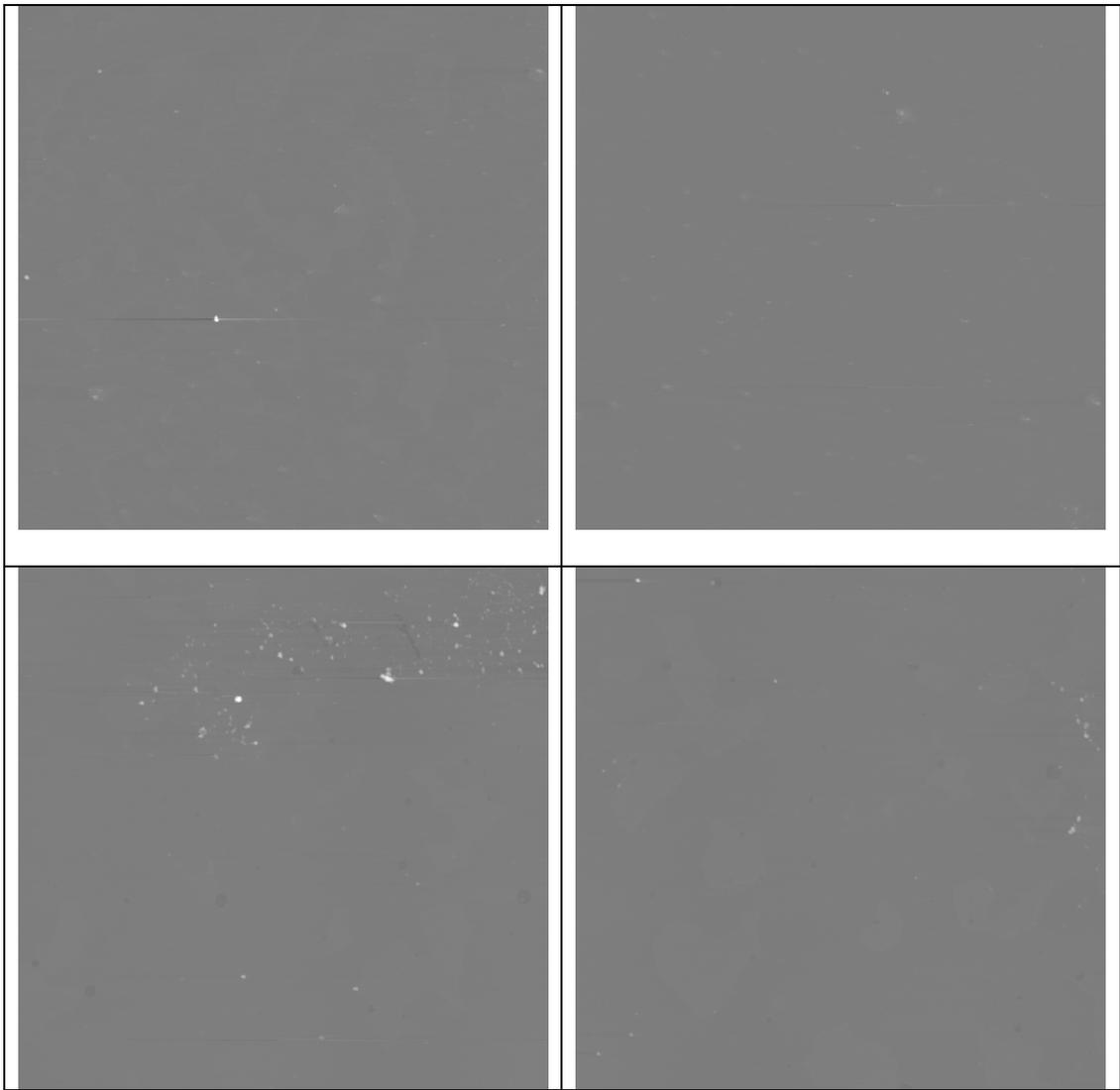


Figure 4 – images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) en NDG du prélèvement L-B d'une couche mixte Apo A-I / DPPC, avec une pression initiale de 30 mN/m. Sur ces images la résolution sur la hauteur des particules est d'environ 0.12 nm. Cette résolution fut utilisée pour nos analyses.

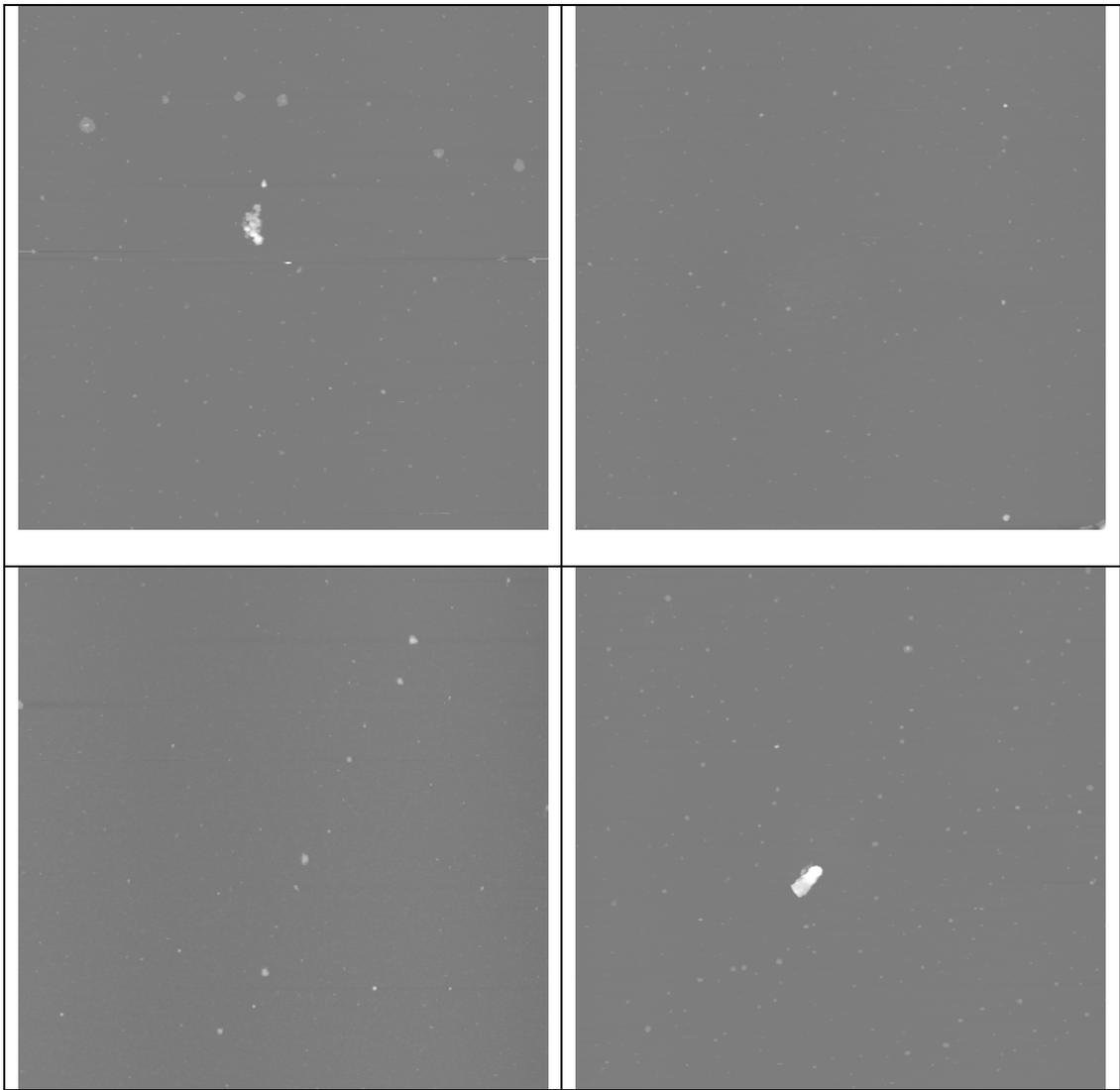


Figure 5 – images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) en NDG du prélèvement L-B d'une couche mixte Apo A-I / DOPC, avec une pression initiale de 30 mN/m. Sur ces images la résolution sur la hauteur des particules est d'environ 0.12 nm. Cette résolution fut utilisée pour nos analyses.

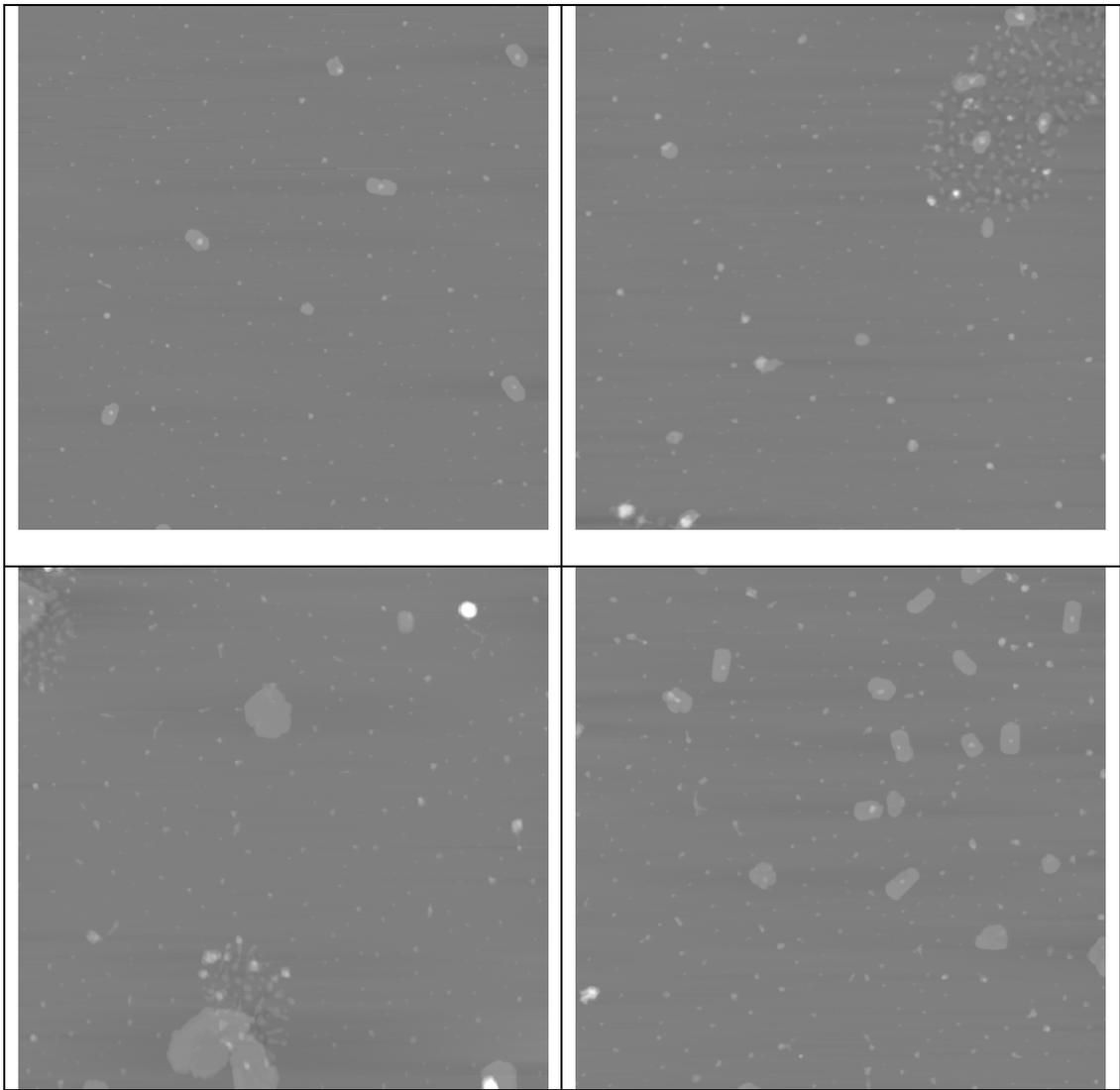


Figure 6 – images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) en NDG du prélèvement L-B d'une couche mixte Apo A-I / DPPG, avec une pression initiale de 30 mN/m. Sur ces images la résolution sur la hauteur des particules est d'environ 0.12 nm. Cette résolution fut utilisée pour nos analyses.

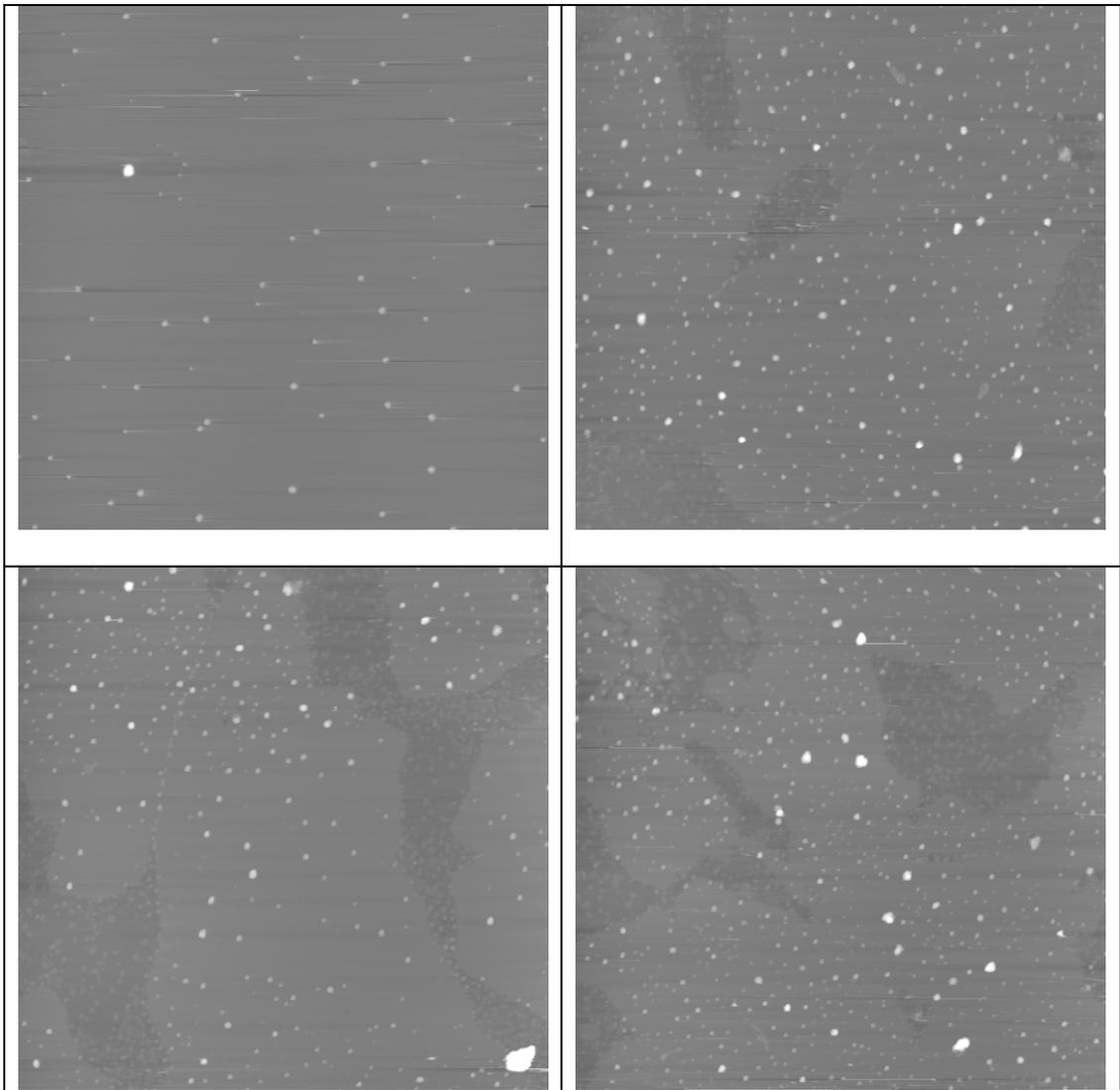


Figure 7 – images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) en NDG du prélèvement L-B d'une couche mixte Apo A-II / DPPC, avec une pression initiale de 15 mN/m. Sur ces images la résolution sur la hauteur des particules est d'environ 0.12 nm. Cette résolution fut utilisée pour nos analyses sur la forme des objets.

ANNEXE 5 : estimation de l'erreur créée par la résolution de l'image sur la mesure de la surface occupée par les particules protéiques

Les images AFM réalisées sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides couvrent une surface de $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ et ont une taille de 512 pixels * 512 pixels, ce qui donne une surface d'environ $15 \times 15 \text{ nm}^2$ pour chaque pixel. La pointe du microscope AFM pouvant être assimilée à une sphère de rayon $r = 10 \text{ nm}$, nous considérons que la résolution de l'image correspond à celle qui nous est donnée par la dimension du pixel, soit environ 250 nm^2 (voir figure 1).

Nous avons voulu savoir quelle est l'influence de cette résolution sur les mesures de la surface occupée par les particules seuillées sur les images AFM. En considérant que la base de ces particules a une forme discoïdale, nous estimons de la manière suivante l'incertitude ΔS sur la surface S d'un objet, à partir de l'incertitude Δr sur le rayon r de cet objet et en posant que $\Delta r = 1 \text{ pixel}$ ((1) p. 50 section 2.2.1 « Propagation des erreurs ») :

$$\begin{aligned}
 S &= \pi \cdot r^2 \\
 \Delta S &= 2\pi \cdot r \cdot \Delta r \\
 \text{Comme } r &= \sqrt{\frac{S}{\pi}} \quad \text{et} \quad \Delta r = 1 \text{ pixel} \\
 \text{Alors } \Delta S &= 2 \cdot \sqrt{\pi \cdot S}
 \end{aligned}$$

Nous pouvons ainsi estimer l'incertitude ΔS_{tot} sur la surface moyenne par image AFM S_{tot} occupée par les particules seuillées, en réalisant le calcul suivant :

$$\begin{aligned}
 \text{Comme } S_{\text{tot}} &= \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^n S_j}{N_{\text{Pix}}} \\
 \text{Alors } \Delta S_{\text{tot}} &= \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^n \Delta S_j^2}}{N_{\text{Pix}}} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^n 4 \cdot \pi \cdot S_j}}{N_{\text{Pix}}} \quad (\text{éq. 1})
 \end{aligned}$$

où, S_j et ΔS_j (en pixels) sont respectivement la surface et l'incertitude sur la surface pour la particule numéro j , associée à l'image AFM numéro i , et N_{Pix} est le nombre de pixels sur l'image AFM.

Les tableaux 1 et 2 montrent les valeurs des incertitudes sur la surface moyenne occupée par les particules seuillées ΔS_{tot} qui nous est imposée par la résolution de l'image AFM. Nous constatons que ces valeurs ne dépassent pas 0.03% de la surface totale de l'image. Elles sont toujours inférieures d'au moins un ordre de grandeur à l'écart type de la distribution de la surface occupée par les particules protéiques sur les images AFM, que nous avons obtenu par notre étude statistique. Nous pouvons donc négliger l'influence de la résolution de l'image sur la mesure de la surface occupée par les particules créées par les protéines dans la couche de lipides.

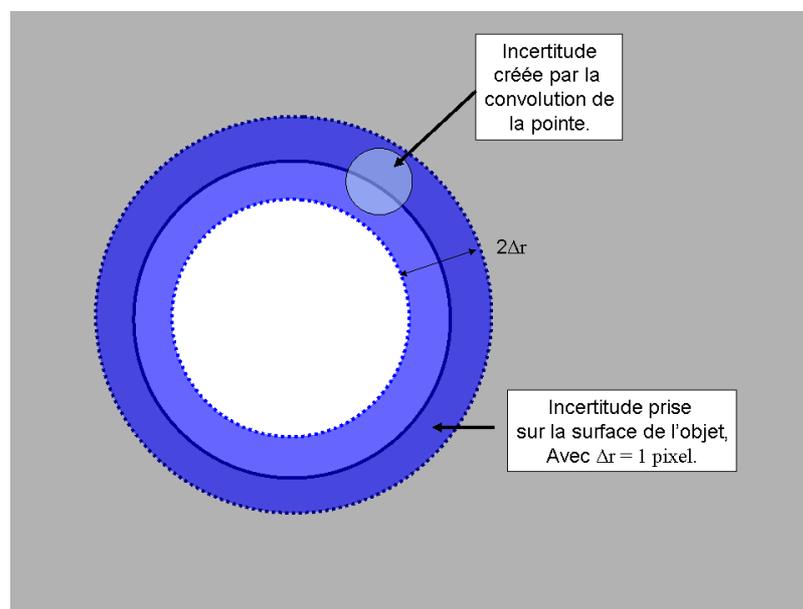


Figure 1 – Représentation des différentes incertitudes sur la surface d'une particule discoïdale (cercle blanc) présente sur l'image AFM. Si nous considérons une incertitude Δr de 1 pixel (illustrée par la couronne bleue) sur le rayon de la particule, alors nous encadrons l'incertitude sur le rayon produite par la convolution de la pointe (illustrée par le petit cercle bleuté).

	Surface occupée par les particules protéiques (%)	ΔS_{tot} (%)
DPPC (30 mN/m)	< 0.05	<0.01
DOPC (30 mN/m)	0.22 +/- 0.12	0.01
DPPG (30 mN/m)	0.54 +/- 0.42	0.02
DOPC (30 mN/m) NDG 149	0.11 +/- 0.11	<0.01

Tableau 1 – Colonne de gauche : surfaces occupées par les particules protéiques sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides (voir chapitre 3 section 2.3.1), pour une pression initiale de 30 mN/m. Les valeurs moyennes et les incertitudes (écart type) sont calculées sur au moins 8 images AFM et deux échantillons de couches mixtes. Colonne de droite : calcul de l'incertitude sur la surface occupée par les particules seuillées sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides d'après l'équation 1, ci-dessus.

	Surface occupée par les particules protéiques (%)	ΔS_{tot} (%)
DPPC (15 mN/m)	0.1 +/- 0.1	0.01
DOPC (15 mN/m)	1.33 +/- 0.51	0.03
DOPC (15 mN/m) NDG 149	0.86 +/- 0.28	0.03

Tableau 2 – Colonne de gauche : surfaces occupées par les particules protéiques sur les couches mixtes Apo A-I/phospholipides (voir chapitre 3 section 2.3.2), pour une pression initiale de 15 mN/m. Les valeurs moyennes et les incertitudes (écart type) sont calculées sur au moins 6 images AFM et deux échantillons de couches mixtes. Colonne de droite : Calcul de l'incertitude sur la surface occupée par les particules seuillées sur les couches mixtes Apo A- I/phospholipides d'après l'équation 1, ci-dessus.

Annexe 6 : Correction sur la distribution des particules protéiques pour la couche mixte Apo A-I/DPPC

Nous avons présenté les résultats concernant la distribution des particules protéiques sur une monocouche d'Apo A-I/DPPC avec une pression initiale de 15 mN/m. Ces résultats ont montré que la coexistence des phases produit une distribution non aléatoire de ces particules sur la couche de lipides avec une insertion plus forte à l'intérieur des domaines LE. Cependant, les résultats concernant l'étude de la distribution de la hauteur des objets, montrés au chapitre 3, indiquent qu'une certaine quantité de ces objets pourraient être des domaines lipidiques en phase LC. Nous avons donc refait l'analyse de la distribution spatiale en ne considérant, en plus des particules présentes sur les zones LC, que les particules de la phase LE dont la hauteur est supérieure à celle des domaines lipidiques, d'après les estimations obtenues sur le lipide pur.

Pour la même image que celle utilisée dans l'étude précédente (figure 5 du chapitre 4), nous montrons sur la figure 1 de cette annexe deux distributions différentes :

1°) La distribution expérimentale des particules sur l'image AFM. Les particules en phase LC sont toujours prises en compte, en seuillant l'image à une hauteur de 1.4 nm (NDG 140) au dessus du lipide. Par contre, si les particules en phase LE sont toujours seuillées à une hauteur de -0.3 nm (NDG 125) au dessous des domaines LC, nous ne retenons au final que celles dont la hauteur dépasse -0.2 nm (supérieure à NDG 126). Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_{Exp}$, $D(r)_{Exp}$ et $V(r)_{Exp}$.

2°) Une distribution simulée et aléatoire de disques « durs », de surface non nulle, sur une image de la taille de l'image AFM. La densité de disques correspond à la densité de particules sur l'image expérimentale en tenant compte des deux phases. La fonction statistique utilisée pour générer la taille des disques est toujours la même. Les fonctions de distribution obtenues se nomment : $g(r)_H$, $D(r)_H$ et $V(r)_H$.

Cette distribution prend en compte 260 particules et nous avons réalisé des tests de reproductibilité sur les quatre autres images déjà utilisées dans l'étude précédente.

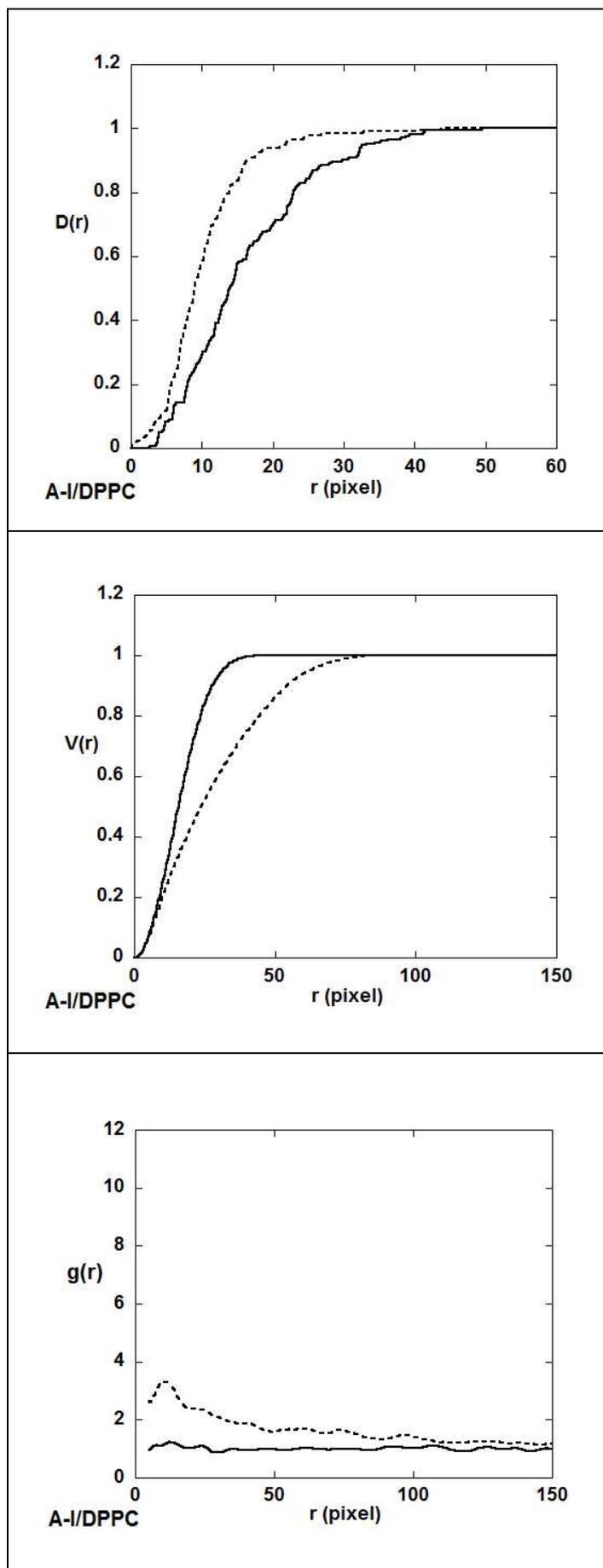


Figure 1 - Graphes de $D(r)$ (A), $V(r)$ (B) et $g(r)$ (C) pour l'image AFM de la couche mixte Apo A-I/DPPC montrée sur la figure 5 du chapitre 4, après élimination des particules pouvant être des domaines LC de taille nanométrique. La distribution de disques est en trait épais et la distribution expérimentale en pointillés.

Les graphes obtenus montrent les mêmes tendances que celle observées lorsque nous considérons la totalité des particules seuillées : $D(r)_{\text{exp}}$ croît plus vite avec r que $D(r)_H$, $V(r)_{\text{exp}}$ croît plus lentement avec r que $V(r)_H$ et pour finir $g(r)_{\text{exp}}$ est supérieur à $g(r)_H$ pour les faibles valeurs de r . L'analyse de la distribution spatiale montre ainsi que le regroupement des objets est à la fois visible dans le cas où le nombre de particules protéiques en phase LE est peut-être surestimé, et dans le cas où ce nombre est peut-être sous-estimé (élimination des objets pouvant être des domaines lipidiques). Nos résultats prouvent donc que distribution des particules formées par la protéine dans une couche de DPPC avec coexistence des phases n'est pas aléatoire, contrairement à DOPC, et que la phase influence fortement à cette échelle la répartition de la protéine.

Bibliographie des annexes

1. Protassov K. 1999. Probabilités et incertitudes dans l'analyse des données expérimentales. Collection Grenoble Sciences - PUG.