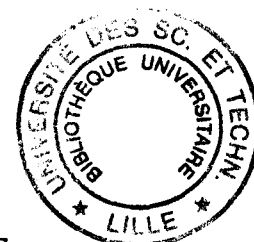


**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**  
**UFR de Biologie**



**THESE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR**  
**DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**Option Sciences de la Vie et de la Santé**

**présentée par**  
**Ludovic DEMOOR**

## **Conception d'un modèle synthétique d'apolipoprotéine**

**Application à l'étude des propriétés physico-chimiques et**  
**biologiques d'un domaine de l'apolipoprotéine A-I**

### **Membres du Jury**

**Monsieur le Professeur André VERBERT**  
**Madame le Docteur Maryvonne ROSSENEU**  
**Monsieur le Professeur Philippe GAMBERT**  
**Monsieur le Professeur Jean-Charles FRUCHART**  
**Monsieur le Professeur André TARTAR**  
**Monsieur le Docteur Christophe BOUTILLON**

**Président**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Examineur**  
**Examineur**

Ce travail est le fruit d'une étroite collaboration entre deux laboratoires de l'institut Pasteur de Lille :

Le service d'étude et de recherche sur les lipoprotéines et l'athérosclérose (SERLIA) - Unité INSERM 325, dirigé par le professeur Jean-Charles FRUCHART

Le service de chimie des biomolécules - Unité CNRS 1309, dirigé par le professeur André TARTAR

Je tiens à remercier très sincèrement

Monsieur le Professeur André VERBERT

de l'honneur que vous me faites de présider ce jury de thèse

Madame le Docteur Maryvonne ROSSENEU

de m'avoir accueilli si chaleureusement au sein de votre laboratoire pendant près d'un an et d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse

Monsieur le Professeur Philippe GAMBERT

d'avoir accepté spontanément d'être rapporteur de cette thèse

Monsieur le Professeur André TARTAR

d'avoir très largement contribué à la genèse et à l'encadrement de ce travail au sein de l'unité 1309 CNRS

Monsieur le Professeur Jean-Charles FRUCHART

d'avoir accepté que ce travail soit réalisé au sein de l'unité 325 INSERM

Monsieur le Docteur Christophe BOUTILLON

d'avoir encadré avec patience et bienveillance ces années de recherche

Je vous prie de trouver ici la marque de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je souhaite également remercier vivement Catherine FIEVET et Véronique CLAVEY pour l'aide et l'attention qu'elles ont bien voulu m'accorder du début à la fin de cette thèse.

J'associe à ces remerciements l'ensemble des membres du laboratoire de chimie des biomolécules et du SERLIA.



## ABBREVIATIONS

apo :	apolipoprotéine.
ATR :	Attenuated total reflection (spectroscopie infrarouge)
BOP :	benzotriazole-1-yl-oxy-tris-diméthylamino-phosphonium-hexafluorophosphate
CD :	Dichroïsme circulaire.
CE :	Cholestérol estérifié.
CETP :	Cholesteryl ester transfert protein.
C :	Cholestérol
Da :	Dalton
DIEA :	diisopropylethylamine
DLPC :	1-2-dilauroyl-sn-glycero-phosphatidylcholine.
DMEM :	Dulbecco's modified eagle medium.
DMF :	Diméthylformamide
DMPC :	1-2-dimyristoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine.
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPH :	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPPC :	1-2-dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine.
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique.
Fmoc :	9-fluorenylméthoxy-carbonyl
HBP :	HDL binding protein.
HBTU :	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate
HDL :	Lipoprotéine de haute densité.
HL :	Lipase hépatique.
HOBT :	1-hydroxy-benzotriazole
HPL :	Human placental lactogen.
kDa :	Kilo Dalton
L-FABP :	Liver-fatty acid binding protein.
LAP :	Lipid associating peptide.
LCAT :	Lecithin cholesterol acyl transferase (EC 2.3.1.43).
LDL :	Lipoprotéine de basse densité.
LPDS :	Serum déficient en lipoprotéine.
LPL :	Lipoprotéine lipase (EC 3.1.1.34).
MAP :	Multiple antigen peptide
Map :	Model amphipathic $\alpha$ -helical peptide
MEM :	Minimum essential medium.
MHP :	Potentiel moléculaire d'hydrophobicité
MLV :	Large vesicles multilamellaires
NMP :	N-méthyl-2-pyrrolidone
NOESY :	Nuclear overhauser effect spectroscopy
OMS :	Organisation mondiale pour la santé
p-MBHA :	Para-methyl benzhydrylamine
PBS :	Phosphate buffer salin
PKC :	Proteine kinase C
PL :	Phospholipide
POPC :	1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
RIA :	Radio-immunoassay
SAB :	Serum albumine bovine
SAP :	Sperm activating protein
SCP-2 :	Sterol carrier protein.
SUV :	Small unilamellar vesicle
SVF :	Serum de veau foetal
t-Boc :	tert-butyloxycarbonyl
TAMMO :	Theoretical analysis of membrane molecular organization
TOCSY :	Total correlation spectroscopy
TFE :	Trifluoroéthanol

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

## PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I. LES LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE .....	3
--	---

<b>1. Introduction .....</b>	<b>3</b>
1.1. Définition .....	3
1.2. Distribution plasmatique .....	5
<b>2. Structure et composition des HDL.....</b>	<b>5</b>
2.1. Structure des HDL.....	5
2.2. Composition lipidique.....	7
2.3. Apolipoprotéines.....	9
2.4. Autres protéines associées aux HDL .....	12
<b>3. Classification des HDL.....</b>	<b>14</b>
3.1. Classification selon Gofman et coll.....	14
3.2. Classification selon Alaupovic et coll.....	15
3.3. Les particules pré- $\beta$ .....	16
<b>4. Métabolisme des lipoprotéines de haute densité.....</b>	<b>16</b>
4.1. Origine des HDL.....	16
4.2. Le transport inverse du cholestérol .....	19

CHAPITRE II. STRUCTURE ET FONCTION DE L'APOLIPOPROTEINE A-I .....	28
---	----

<b>1. Structure de l'apolipoprotéine A-I.....</b>	<b>28</b>
1.1. Structure primaire de l'apoA-I.....	28
1.2. Structures secondaire et tertiaire de l'apoA-I .....	30
1.3. Structure quaternaire de l'apoA-I non associée aux lipides .....	42
<b>2. Structure de l'apolipoprotéine A-I associée aux HDL .....</b>	<b>42</b>
2.1. les méthodes de reconstitutions de HDL .....	43
2.2. Etudes structurales des HDL reconstituées .....	45
2.3. Variants naturels et mutagénèse dirigée .....	52
2.4. Conclusion.....	53
<b>3. Fonction de l'apoA-I. ....</b>	<b>53</b>
3.1. Activation de la LCAT.....	53
3.2. Interaction avec la membrane cellulaire.....	57
3.3. Efflux de cholestérol.....	63
3.4. Autres propriétés de l'apolipoprotéine A-I.....	64

**SECONDE PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX****CHAPITRE III. ASSOCIATION DE FRAGMENTS SYNTHETIQUES D'APOA-I HUMAINE  
AVEC DES PHOSPHOLIPIDES..... 66**

<b>1. Introduction .....</b>	<b>66</b>
<b>2. Prediction structurale et modélisation moléculaire.....</b>	<b>68</b>
2.1. Utilisation des méthodes prédictives classiques.....	68
2.2. Modélisation moléculaire.....	72
<b>3. Synthèse des peptides .....</b>	<b>77</b>
1.1. Synthèse automatisée en phase solide .....	77
1.2. Clivage de la résine et déprotection des peptides.....	81
1.3. Elimination des <i>scavengers</i> et solubilisation du peptide.....	82
<b>4. Purification et caractérisation des peptides.....</b>	<b>83</b>
3.1. Analyse des produits bruts de coupure HF.....	83
3.2. Purification des peptides.....	85
3.3. Caractérisation des peptides .....	85
3.4. Synthèse et purification des peptides dansylés.....	91
<b>5. Association des peptides avec les phospholipides. ....</b>	<b>91</b>
4.1. Mesures de turbidité .....	91
4.2. Affinité des peptides pour les phospholipides.....	92
<b>6. Reconstitution et caractérisation de HDL discoïdales.....</b>	<b>98</b>
5.1. Reconstitution et purification des HDL reconstituée.....	98
5.2. Microscopie électronique.....	100
5.3. Caractérisation physicochimique des HDL reconstituées.....	102
5.4. Mesures de turbidité .....	103
5.5. Polarisation de fluorescence .....	105
5.6. Calorimétrie.....	106
5.7. Etude de la structure secondaire des peptides par dichroïsme circulaire.....	108
5.8. Etude structurale du peptide apoA-I [166-183] par RMN.....	111
5.9. Orientation des hélices au sein des HDL reconstituées .....	114
<b>7. Discussion.....</b>	<b>115</b>
<b>8. Conclusion. ....</b>	<b>119</b>
<b>9. Publication. ....</b>	<b>119</b>

**CHAPITRE IV. ETUDE DE PEPTIDES DENDRIMERIQUES ISSUS DE LA POLYMERISATION  
DE FRAGMENTS D'APOA-I HUMAINE.....120**

<b>1. Introduction .....</b>	<b>120</b>
<b>2. Conception et synthèse des peptides dendrimériques.....</b>	<b>123</b>
2.1. Conception.....	122
2.2. Synthèses des supports arborescents.....	122
2.3. Synthèse et purification des peptides dendrimériques.....	123

<b>3. Caractérisation des peptides dendrimériques</b> .....	<b>132</b>
3.1. Identification.....	132
3.2. Homogénéité.....	136
<b>4. Association des peptides dendrimériques avec des phospholipides.</b>	<b>137</b>
4.1. Etude du comportement des différentes constructions dérivées de la séquence apoA-I [145-183] en RP-HPLC.....	137
4.2. Mesures de turbidité.....	139
<b>5. Reconstitution et caractérisation de HDL discoidales</b> .....	<b>143</b>
5.1. Reconstitution et purification de HDL discoïdales.....	143
5.2. Microscopie électronique.....	146
5.3. Caractérisation physico-chimique des HDL reconstituées.....	147
5.4. Polarisation de fluorescence.....	159
<b>6. Structure secondaire</b> .....	<b>149</b>
6.1. Dichroïsme circulaire.....	150
6.2. RMN.....	152
<b>7. Discussion</b> .....	<b>155</b>
<b>8. Conclusion</b> .....	<b>159</b>
<b>9. Publication</b> .....	<b>159</b>

**CHAPITRE V. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES HDL RECONSTITUEES  
AVEC LES PEPTIDES DENDRIMERIQUES.....160**

<b>1. Introduction</b> .....	<b>160</b>
<b>2. Immunoreactivite des peptides synthétiques</b> .....	<b>160</b>
2.1. Etude Radio-immunologique.....	161
2.2. Approche par la technique BIACORE.....	164
<b>3. Capacité de fixation aux cellules HeLa</b> .....	<b>167</b>
2.1. Le modèle cellulaire HeLa.....	167
2.2. Etude de la fixation des HDL reconstituées sur cellules HeLa.....	167
<b>4. Efflux de cholestérol</b> .....	<b>171</b>
4.1. Modèles cellulaires.....	172
4.2. Efflux de cholestérol.....	172
<b>5. Activation de la LCAT</b> .....	<b>176</b>
5.1. Reconstitution de complexes DPPC/trimère apoA-I [145-183]/cholestérol... ..	176
5.2. Activation de la LCAT par des de complexes DPPC/trimère apoA-I [145-183]/cholestérol.....	178
<b>6. Discussion</b> .....	<b>179</b>
<b>7. Perspectives</b> .....	<b>183</b>
<b>8. Communication</b> .....	<b>183</b>

<b>CHAPITRE VI. APPROCHE COMBINATOIRE - RESULTATS PRELIMINAIRES .....</b>	<b>184</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>184</b>
<b>2. Conception et synthèse d'une construction peptidique dégénérée ...</b>	<b>186</b>
2.1. Conception de la construction Deg <sub>1</sub> (apoA-I 145-183).....	186
2.2. Synthèse de Deg <sub>1</sub> (apoA-I 145-183).....	189
2.3. Caractérisation de Deg <sub>1</sub> (apoA-I 145-183).....	190
<b>3. Association de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) avec des phospholipides.....</b>	<b>192</b>
3.1. Mesures de turbidité.....	192
3.2. Essais de reconstitution de HDL.....	193
<b>4. Structure secondaire de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183).....</b>	<b>194</b>
<b>5. Immunoreactivité de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) .....</b>	<b>197</b>
<b>6. Discussion.....</b>	<b>199</b>
<b>8. Perspectives.....</b>	<b>200</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>204</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>207</b>
<b>FICHES TECHNIQUES .....</b>	<b>226</b>



**Première Partie**

**Données Bibliographiques**

## INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardio-vasculaires constituent encore aujourd'hui la première cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés<sup>1</sup>. En 1990, sur 10,9 millions de décès intervenus dans les dits pays, plus de 5 millions ont été causés par des maladies cardio- ou cérébro-vasculaires<sup>2</sup>. En France, pour l'année 1991, 48% des décès chez les hommes et 65% chez les femmes furent provoqués par ces maladies. Cependant, les dernières statistiques de l'O.M.S. indiquent une régression de la mortalité par maladies cardio-vasculaires dans les pays riches. En effet, l'aspect préventif du traitement de ces maladies (lutte contre le tabagisme, séro-surveillance) a été pris en compte dans de nombreux pays et les mesures prises en ce sens sont sans doute, en grande partie responsable de la diminution des risques cardio-vasculaires dans les pays développés. En revanche, ces mêmes statistiques laissent entrevoir, lors de ces dix dernières années, un déclin rapide de la santé cardio-vasculaire dans les pays en voie de développement. Selon les chiffres donnés par l'O.M.S., plus d'un décès sur deux causé par maladie cardio-vasculaire intervient dans un pays en phase d'expansion<sup>3</sup>. La composante préventive du traitement de ces maladies, dont l'efficacité est démontrée dans les pays développés, risque d'être plus longue et plus difficile à mettre en place dans les autres pays pour des raisons culturelles ou sociales. La lutte contre le risque cardio-vasculaire constitue donc, aujourd'hui encore, une priorité au niveau mondial dans le domaine de la santé.

L'athérosclérose est une maladie qui entraîne progressivement la diminution de la lumière des artères par une accumulation de lipides (plaque d'athérome) au niveau de leur paroi, entravant ainsi la circulation sanguine. Lorsque cette accumulation réduit le diamètre d'une artère coronaire, un thrombus (caillot de petite dimension) peut boucher celle-ci et conduire à l'accident cardiaque. Les perturbations du métabolisme des lipoprotéines, qui assurent le transport des lipides dans le sang, sont étroitement liées aux risques de développement de cette plaque d'athérome. De nombreux travaux, et en particulier ceux de Brown et Goldstein<sup>4</sup>, ont montré qu'une concentration plasmatique élevée en lipoprotéines de faible densité (LDL) constitue un facteur de risque cardio-vasculaire. En revanche, l'augmentation du taux de lipoprotéines plasmatiques de haute densité (HDL), coïncide avec une diminution de ce risque. Ce caractère anti-athérogène des HDL a été démontré pour la première fois par Miller et Miller<sup>5</sup> sur la base d'une étude clinique et cette conclusion a été confirmée par d'autres études épidémiologiques<sup>6,7</sup>. Depuis, de nombreux autres travaux<sup>8,9,10</sup> démontrent l'existence d'une corrélation inverse entre la concentration plasmatique en HDL et le risque d'athérosclérose.

L'apolipoprotéine A-I (apoA-I), qui présente une forte corrélation inverse avec le risque de maladies coronariennes, est l'apolipoprotéine majeure des HDL. De ce fait, elle a fait l'objet de nombreuses études structurales et métaboliques. Toutefois, le mécanisme qui confère à cette



protéine son caractère anti-athérogène est encore mal connu. L'hypothèse la plus répandue est qu'elle prendrait une part active dans un processus d'épuration du cholestérol des cellules périphériques, appelé "transport inverse du cholestérol" qui permet l'acheminement du cholestérol des cellules vers le foie via les HDL. L'implication de l'apoA-I dans ce processus physiologique est encore mal explicité. Certes, il est clairement établi que l'apoA-I active la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), enzyme responsable de la formation de la plupart des esters de cholestérol plasmatique<sup>11</sup>. D'autre part, quelques laboratoires ont mis en évidence la présence de protéines de fixation de HDL sur les membranes plasmiques de cellules en culture<sup>12.13.14</sup> et l'apoA-I semble être impliquée dans de cette fixation<sup>15.16.17</sup>. Des études récentes<sup>18.19.20</sup>, montrent qu'une séquence particulière de l'apolipoprotéine A-I pourrait intervenir au niveau de la fixation des HDL sur les membranes cellulaires. Ce domaine, correspondant à la séquence 145-183 de l'apolipoprotéine, interagirait de façon spécifique avec la membrane des cellules par un mécanisme encore inconnu. Cependant, l'importance de cette interaction cellulaire dans l'efflux de cholestérol, l'étape préliminaire du transport inverse, n'a jamais pu être clairement démontrée. De plus, l'apoA-I ne semble pas être la seule apolipoprotéine impliquée, l'apoA-II et l'apoA-IV étant également capables d'interagir avec la membrane plasmique des cellules<sup>21.22</sup>.

Grâce a des techniques de reconstitution d'HDL<sup>23</sup>, il est possible de produire *in vitro* des particules proches des HDL natives, composés d'une part, de phospholipides, et d'autre part, d'apolipoprotéine purifiée. Ces techniques ont permis ces dix dernières années d'étudier les apolipoprotéines séparément les unes des autres et de déterminer les capacités physico-chimiques et physiologiques des diverses apolipoprotéines entrant dans la composition des HDL. En revanche, l'étude des domaines actifs de ces apolipoprotéines est beaucoup plus délicate. L'outil immuno-chimique a pour le moment été principalement utilisé, mais la partie C-terminale de l'apolipoprotéine est peu immunogène<sup>24</sup> et par conséquent la batterie d'anticorps disponible pour ce type d'étude reste très limitée. Par ailleurs, l'obtention de mutants d'apolipoprotéine par mutagenèse dirigée est difficile et les mutants sont souvent produits en trop faible quantité pour permettre la reconstitution d'HDL. Les modifications chimiques et les digestions enzymatiques d'apolipoprotéine sont informatives dans le but de déterminer la structure des apolipoprotéines au sein des HDL mais peu adaptées à la mise en évidence du rôle physiologique de tels ou tels domaines d'apolipoprotéines. En revanche, la synthèse peptidique peut constituer un outil efficace pour ce type d'étude et nous proposons dans ce travail de thèse la mise au point d'un modèle synthétique permettant l'étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de domaines isolés d'apolipoprotéines au sein d'HDL reconstituées. Après avoir défini le potentiel mais aussi les limites de notre modèle, nous avons appliqué cet outil original à l'étude de la séquence 145-183 de l'apolipoprotéine A-I humaine. Par ailleurs, afin de replacer ce travail dans son contexte scientifique, nous présentons dans une première partie une étude bibliographique portant sur les lipoprotéines de haute densité et l'apolipoprotéine A-I.



## CHAPITRE I. LES LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE

### 1. INTRODUCTION

Mises en évidence par Macheboeuf en 1929, les lipoprotéines de haute densité<sup>25</sup> (HDL pour *High density Lipoprotein*) ont, pendant très longtemps, été uniquement considérées comme un remarquable exemple de complexes lipides-protéines et étudiées indépendamment des autres lipoprotéines du sérum. A l'exception de quelques études portant sur l'origine et l'activité métabolique des HDL, les travaux menés sur ce type de lipoprotéines concernaient essentiellement la nature de la liaison lipide-protéine<sup>26.27</sup>.

L'intérêt pour les HDL fût ravivé en 1975 par des études épidémiologiques<sup>5</sup> mettant en évidence le rôle protecteur des HDL envers le développement prématuré des lésions athérosclérotiques. Le métabolisme et le rôle des HDL, ainsi que les mécanismes complexes permettant aux HDL d'intervenir dans la protection de l'organisme vis-à-vis de l'athérosclérose ont dès lors été étudiés par plusieurs équipes. Ces diverses études démontrent le rôle prépondérant des HDL au niveau du transport des lipides au sein du plasma.

#### 1.1. Définition

Les lipides jouent un rôle central dans le métabolisme humain. Ils participent à de nombreuses fonctions biologiques telles que le maintien de l'intégrité cellulaire, le stockage de l'énergie, ainsi que la transmission et la transduction de signaux cellulaires. Ils constituent par ailleurs, une réserve importante d'intermédiaires métaboliques divers.

La mobilisation de ces composés hydrophobes dans un environnement aqueux tel que le plasma, nécessite la formation d'émulsions stables afin de permettre le transport de ces substances au sein de l'organisme. L'existence d'une enveloppe constituée de protéines (apolipoprotéines) et de phospholipides à la périphérie des globules lipidiques insolubles (triglycérides et esters de cholestérol) permet la formation de telles émulsions. Ces complexes micellaires lipides/protéines qui permettent la solubilisation des lipides plasmatiques sont appelés lipoprotéines.

L'ultracentrifugation analytique a été la première technique utilisée afin de caractériser la distribution des lipoprotéines du plasma humain<sup>28</sup>. Cette méthode de séparation a permis de mettre en évidence quatre classes majeures de lipoprotéines :

- **Les chylomicrons** de densité inférieure à 0,94 dont la fonction principale est le transport des triglycérides issus de l'absorption intestinale.

- **Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL)**, c'est-à-dire comprise entre 0,940 et 1,006 et qui assurent le transport des triglycérides endogènes.

- **Les lipoprotéines de basse densité (LDL)**, c'est-à-dire comprise entre 1,006 et 1,063 et qui contiennent la majeure partie du cholestérol plasmatique.

- **Les lipoprotéines de haute densité (HDL)**, c'est-à-dire comprise entre 1,063 et 1,210 qui sont synthétisées par le foie et l'intestin.

D'autres classifications<sup>29</sup> sont également utilisées pour différencier les lipoprotéines (tableau 1).

**Tableau 1. Principales caractéristiques physiques des lipoprotéines plasmatiques<sup>29</sup>.**

Lipoprotéines	Diamètre (nm)	Masse (MDa)	Mobilité électrophorétique	Apolipoprotéines majoritaires
Chylomicrons	< 10 <sup>4</sup>	>150	origine	apo C - apo B <sub>48</sub>
VLDL	30-80	5-130	pré-bêta	apo B
IDL	15-25	3,5	bêta	apo B
LDL	20-22	2,5	bêta	apo B
HDL	8-15	0,15-0,4	alpha*	apoA-I - apoA-II

\*Une fraction quantitativement mineure des HDL possède une mobilité pré-bêta.

- La mobilité électrophorétique sur gel d'agarose détermine quatre classes différentes. La fraction majeure des HDL est de mobilité alpha tandis qu'une fraction mineure possède une mobilité pré-bêta.

- La chromatographie sur gel d'agarose à 6% permet de différencier trois des quatre classes d'apolipoprotéines précédemment définies en fonction de la taille des particules ou de leur masse moléculaire. Cette technique montre que les HDL sont des particules de petite taille (entre 8 et 15 nm de diamètre) et que leur masse moléculaire ne dépasse pas 300 kDa.

- Enfin, la composition en apolipoprotéines des particules définit deux grandes classes de lipoprotéines. Les lipoprotéines contenant l'apo B comme apolipoprotéine majoritaire (Chylomicrons, VLDL, LDL) et celles comportant surtout des apo A-I et A-II (HDL).

Les HDL peuvent donc être définies comme des complexes lipoprotéiques de petite taille, de densité comprise entre 1,063 et 1,210, dont la mobilité électrophorétique est alpha ou pré-béta, et qui sont constituées d'un coeur lipidique variable et d'une partie protéique composée majoritairement d'apo AI.

## **1.2. Distribution plasmatique**

La concentration plasmatique des HDL, exprimée en masse totale, est comparable à celle des autres lipoprotéines. Cette concentration<sup>29</sup> (entre 1,85 et 3,5 g/l) est, par exemple, du même ordre que celle des LDL (entre 2 et 3,5 g/l).

## **2. STRUCTURE ET COMPOSITION DES HDL**

### **2.1. Structure des HDL**

Les HDL, comme les autres classes de lipoprotéine, possèdent une structure micellaire plus ou moins sphérique, dans laquelle le noyau est composé de lipides hydrophobes (esters de cholestérol, triglycérides). Ce noyau est entouré d'une enveloppe comprenant des phospholipides, du cholestérol, et des apolipoprotéines. La cohésion des molécules au sein de ces complexes micellaires est assurée par des liaisons faibles (interactions de Van der Waals, hydrophobes, et électrostatiques). L'absence de liaisons covalentes explique la propriété que possèdent les différents constituants lipidiques et protéiques d'être facilement échangés d'une particule lipoprotéique à une autre.

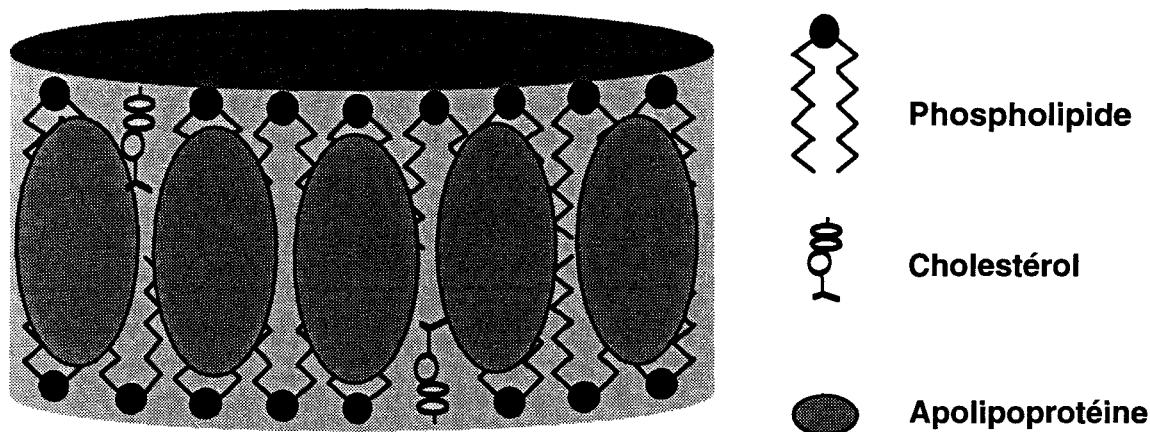


Figure 1. Modèle schématique de l'agencement des constituants dans les HDL naissantes discoïdales.

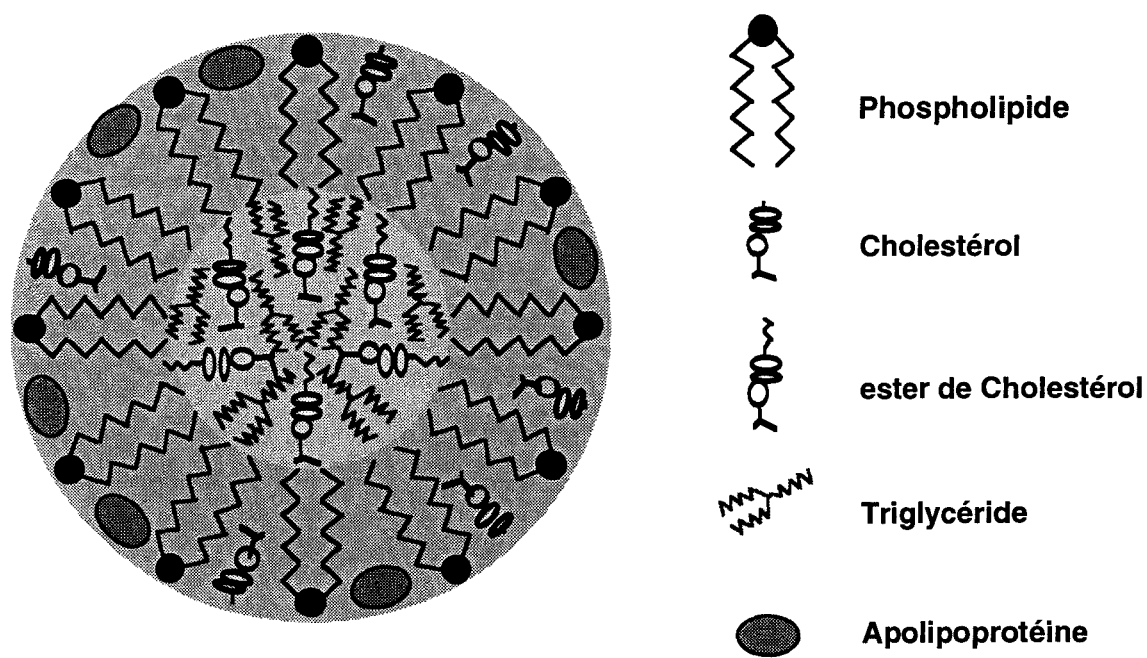


Figure 2. Modèle schématique de l'agencement des constituants dans les HDL sphériques.

Les lipoprotéines de haute densité constituent une population de particules hétérogènes du point de vue de leur forme, de leur taille et de leur composition. De façon classique, on distingue d'abord les HDL naissantes qui sont discoïdales et constituées essentiellement de phospholipides et d'apolipoprotéines (**figure 1**). Elles sont rares dans le plasma et de petite taille.

Ces vésicules discoïdales évoluent ensuite vers un état globulaire plus complexe, contenant des triglycérides et des esters de cholestérol au sein du noyau hydrophobe et du cholestérol, des phospholipides et des apolipoprotéines en périphérie (**figure 2**).

## 2.2. Composition lipidique

Dans les lipoprotéines de basse densité, les lipides sont majoritairement représentés (> 65%). En revanche, dans les HDL, la proportion lipide/protéine est plus équilibrée puisque seulement 43% en moyenne de leur masse est constituée de lipides<sup>29</sup> (**tableau 2**).

**Tableau 2. Composition protéique et lipidique moyenne de différentes classes de lipoprotéines plasmatiques<sup>29</sup>.**

TG : triglycérides, PL : phospholipides, C : cholestérol non estérifié, CE : esters de cholestérol.

Lipoprotéines	Composition (% en masse de lipoprotéines)				
	Protéine*	TG	PL	C	CE
Chylomicrons	2	90	5	1	2
VLDL	10	54	16	7	13
LDL	23	4	21	11	41
HDL	57	3	28	3	10

\* La composition en protéine inclut celle des glycanes.

Les phospholipides (**Figure 3**), lipides composés de deux chaînes alkyles et d'une tête polaire, représentent en moyenne 30% du contenu lipidique des HDL. Ce sont en grande partie des phospholipides de la famille des phosphatidylcholines (70 à 80%) et dans une moindre proportion des sphingomyélines (10 à 15%).

La proportion moyenne de cholestérol non estérifié dans les HDL est faible puisqu'elle représente moins de 6% des lipides présents. Le cholestérol est retrouvé préférentiellement sous la forme d'ester de cholestérol (20% des lipides) c'est à dire estérifié par un acide gras au

niveau de la fonction alcool du cholestérol. L'acide gras majoritairement retrouvé comme substituant du cholestérol au sein de ces lipoprotéines est l'acide linoléique<sup>28</sup>.

Les triglycérides, enfin, représentent en moyenne 6% de la masse lipidique totale. Les acides gras de ces molécules étant constitués de 35 à 45% d'acide oléique.

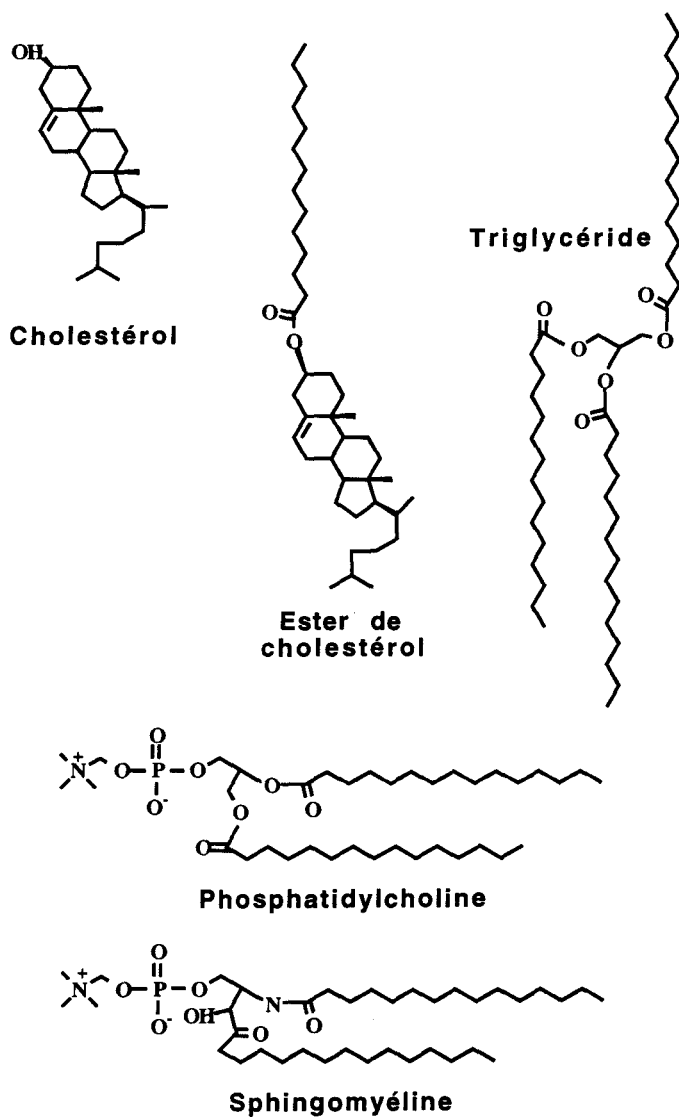


Figure 3. Principaux constituants lipidiques des HDL.

### 2.3. Apolipoprotéines

La proportion relative des apolipoprotéines dans les HDL atteint en moyenne 57% de la masse totale<sup>29</sup>. Cette proportion est beaucoup plus faible dans les autres classes de lipoprotéines. La composante protéique des HDL est complexe bien qu'essentiellement représentée par les apoA-I et A-II qui constituent à elles seules, 80 à 90% de la masse protéique totale. On retrouve également en moindres quantités l'apoA-IV, les apo C, l'apo E, et enfin les apo D, F, H et J. Les différentes apolipoprotéines associées aux HDL, ainsi que leurs fonctions et sites de synthèse<sup>30</sup> sont représentés dans le **tableau 3**.

- L'apolipoprotéine A-I.

Le gène de l'apoA-I humaine (243 AA) se situe sur le chromosome 11 et fait partie du complexe génique A-I/C-III/A-IV. Cette apolipoprotéine est synthétisée dans le foie et l'intestin<sup>31</sup>. Sa concentration plasmatique<sup>29</sup> varie entre 1,2 et 1,4 g/l.

Chez l'homme, l'apoA-I se retrouve essentiellement dans les HDL (90%). Cette apolipoprotéine est néanmoins présente en faible quantité dans les Chylomicrons qui joueraient le rôle de transporteur de l'apoA-I synthétisée dans l'intestin. Cette fraction d'apoA-I serait ensuite déplacée vers les HDL lors de la lipolyse. Nous reviendrons plus en détail sur la structure et les fonctions métaboliques de l'apolipoprotéine A-I dans le second chapitre de cette étude bibliographique.

- L'apolipoprotéine A-II.

Le gène de l'apoA-II humaine (77 AA) se situe sur le chromosome 1 et comprend 4 exons<sup>32</sup>. Le lieu de synthèse majoritaire de l'apolipoprotéine A-II chez l'homme est le foie<sup>31</sup> et dans une moindre mesure l'intestin<sup>33</sup>. Après l'apoA-I, l'apolipoprotéine A-II est la seconde protéine des HDL (10 à 23%). Sa concentration plasmatique<sup>29</sup> s'échelonne entre 0,35 et 0,5 g/l. Elle est essentiellement associée à l'apoA-I dans les HDL et n'est pas présente dans les autres lipoprotéines.

Le rôle de l'apoA-II est encore très mal connu. Outre un rôle structural, dû à son caractère très hydrophobe, l'apoA-II intervient également en tant que régulateur des enzymes impliquées dans le métabolisme plasmatique des lipides. En effet, cette apolipoprotéine est capable de moduler l'activité de la lipase hépatique<sup>34</sup>. De plus, elle jouerait un rôle non négligeable dans le transport inverse du cholestérol en régulant l'activité de la LCAT<sup>35</sup> (Lécithine cholestérol acyl

transférase) et la modulation de l'efflux de cholestérol<sup>36</sup>. Enfin, l'apolipoprotéine A-II est capable de se fixer spécifiquement sur la membrane de nombreux types de cellules<sup>12,16,22</sup>.

**Tableau 3. Principales lipoprotéines associées aux HDL chez l'homme.**

apolipoprotéines	lieu(x) de synthèse	nombre d'acides aminés	fonctions et propriétés	répartition dans les HDL en % de masse d'apo.
ApoA-I	Foie Intestin	243	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<b>Rôle structural</b></li> <li>•<b>Activateur de la LCAT</b></li> <li>•Ligand de certains sites de reconnaissance cellulaire</li> <li>•Rôle dans le transport inverse du cholestérol</li> </ul>	62 à 65%
ApoA-II	Foie Intestin	2 x 77	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<b>Rôle structural</b></li> <li>•Ligand de certains sites de reconnaissance cellulaire</li> <li>•Activateur de la lipase hépatique</li> <li>•Déplace l'apoA-I au sein des HDL</li> </ul>	10 à 23%
ApoA-IV	Foie Intestin	376	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Activateur de la LCAT</li> <li>•Ligand de certains sites de reconnaissance cellulaire</li> <li>•Rôle dans le transport inverse du cholestérol</li> <li>•Module l'activité LPL</li> </ul>	0 à 12 %
ApoC-I	Foie	57	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Activation <i>in vitro</i> de la LCAT et de la LPL</li> <li>•Inhibe la phospholipase A2</li> </ul>	2 à 13%
ApoC-II	Foie Intestin	79	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<b>Activateur de la LPL</b></li> <li>•Activateur de la LCAT</li> </ul>	
ApoC-III	Foie	79	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Module l'activité LPL</li> <li>•Inhibe l'internalisation par le foie des lipoprotéines de basse densité</li> </ul>	
Apo E	Foie Reins Intestin Muscles Cerveau Macrophages	299	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<b>Ligand des récepteurs B/E, LRP et VLDL</b></li> </ul>	1 à 3%
Apo D	Foie Rate Intestin Placenta	169	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Fixe la bilirubine</li> <li>•Capteur potentiel de radicaux libres</li> </ul>	2 à 4%
Apo F	ND	162	N.D.	Traces
Apo H	N.D.	326	•Activateur de la LPL	Traces
Apo J	N.D.	427	N.D.	Traces



- L'apolipoprotéine A-IV.

A l'instar de l'apolipoprotéine A-I, le gène de l'apoA-IV humaine (376 AA) se situe sur le chromosome 11 et fait partie du complexe génique A-I/C-III/A-IV<sup>37</sup>. Cette apolipoprotéine est principalement synthétisée au niveau du foie et de l'intestin<sup>37</sup>.

Le rôle physiologique de l'apolipoprotéine A-IV dans le métabolisme des lipoprotéines est encore mal connu. De nombreuses études<sup>38,39</sup> suggèrent que l'apoA-IV pourrait jouer un rôle fonctionnel dans la sécrétion des triglycérides sous forme de lipoprotéines de très basse densité (VLDL et Chylomicrons). Par ailleurs, l'apoA-IV serait impliquée dans le transport inverse du cholestérol au niveau de l'efflux de cholestérol des cellules périphériques<sup>40,41</sup> et au niveau de l'activation la LCAT<sup>42</sup>. Cependant, cette activation reste, *in vitro*, très inférieure à celle obtenue avec l'apoA-I<sup>43</sup>. En outre, au niveau intravasculaire, l'apoA-IV serait capable d'augmenter le potentiel activateur de l'apoC-II envers la lipoprotéine lipase et faciliterait ainsi la lipolyse des Chylomicrons<sup>44</sup>.

- L'apolipoprotéine E.

Le gène de l'apo E humaine (299 AA) se situe sur le chromosome 19 et le produit du gène est une protéine sialylée de 299 acides aminés<sup>45</sup>. Cette apolipoprotéine est synthétisée chez l'homme par le foie mais aussi par le cerveau, les glandes surrénales, la rate et par d'autres tissus<sup>46</sup>. Les macrophages peuvent également libérer de grandes quantités d'apo E<sup>47</sup>.

Dans la circulation sanguine, l'apo E est associée aux Chylomicrons, aux VLDL et aux HDL. Sa principale fonction est d'assurer la reconnaissance et la clairance plasmatique de ces lipoprotéines soit par le "LDL-récepteur" qui est présent à la surface de toutes les cellules et qui reconnaît également l'apo B, soit par le récepteur LRP des hépatocytes, spécifique de l'apo E<sup>48,49</sup>, et par le VLDL-récepteur<sup>50</sup>.

- Les apolipoprotéines du groupe C.

Parmi les apolipoprotéines du groupe C, on distingue l'apoC-I, l'apoC-II, et l'apoC-III composées respectivement de 57<sup>51</sup>, 79<sup>52</sup>, et 79<sup>53</sup> acides aminés. Les gènes des apoC-I et C-II sont localisés sur le chromosome 19, tandis que le gène de l'apoC-III fait partie, sur le chromosome 11, du complexe génique A-I/C-III/A-IV. Elles sont synthétisées au niveau du foie, ainsi qu'au niveau de l'intestin dans le cas de l'apoC-II.

Les rôles métaboliques dévolus aux apo C concernent la modulation d'activités enzymatiques en rapport avec le métabolisme des lipides. Une étude<sup>54</sup> montre que l'apoC-I active la LCAT *in vitro*, cependant le potentiel d'activation pour cette apolipoprotéine reste très inférieur à celui de l'apoA-I<sup>35</sup>. L'apoC-I active également la lipoprotéine lipase<sup>55</sup> (LPL) et inhibe la phospholipase A<sub>2</sub>. L'apoC-II constitue, quant à elle, le cofacteur indispensable de la LPL. L'apoC-III, en revanche, est considérée comme une protéine modulatrice de l'activation de la LPL par l'apoC-II. En outre, elle inhibe la triglycéride lipase hépatique.

#### 2.4. Autres protéines associées aux HDL

D'autres protéines entrent également dans la composition des HDL. Ces protéines représentent un faible pourcentage en masse mais leur importance au niveau du métabolisme des HDL est considérable. Il s'agit de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), la protéine de transport du cholestérol estérifié (CETP) et la protéine de transport des phospholipides (PLTP).

- La Lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT).

La LCAT (EC 2.3.1.43.), enzyme clef du métabolisme des lipoprotéines plasmatiques, est synthétisée par le foie. La protéine mature comporte 416 acides aminés (45 kDa) et porte 4 sites de glycosylation conduisant à une masse moléculaire apparente de 60 kDa<sup>56</sup>. Elle catalyse la coupure et le transfert d'un acide gras en position sn-2 de la phosphatidylcholine vers une molécule de cholestérol avec formation d'une liaison ester, produisant ainsi de la lysolécithine et du cholestérol estérifié (**figure 4**).

- La Protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP).

La CETP est une protéine synthétisée chez l'homme par le foie, l'intestin, la rate et les glandes surrénales. Le cDNA de la CETP, tel qu'il est synthétisé dans le foie, code pour une protéine de 476 acides aminés (53 kDa)<sup>57</sup>. Cependant, dans le plasma, la CETP circule sous la forme d'une glycoprotéine de 74 kDa. Son rôle est de faciliter le transfert des esters de cholestérol depuis les HDL vers les lipoprotéines riches en triglycérides.

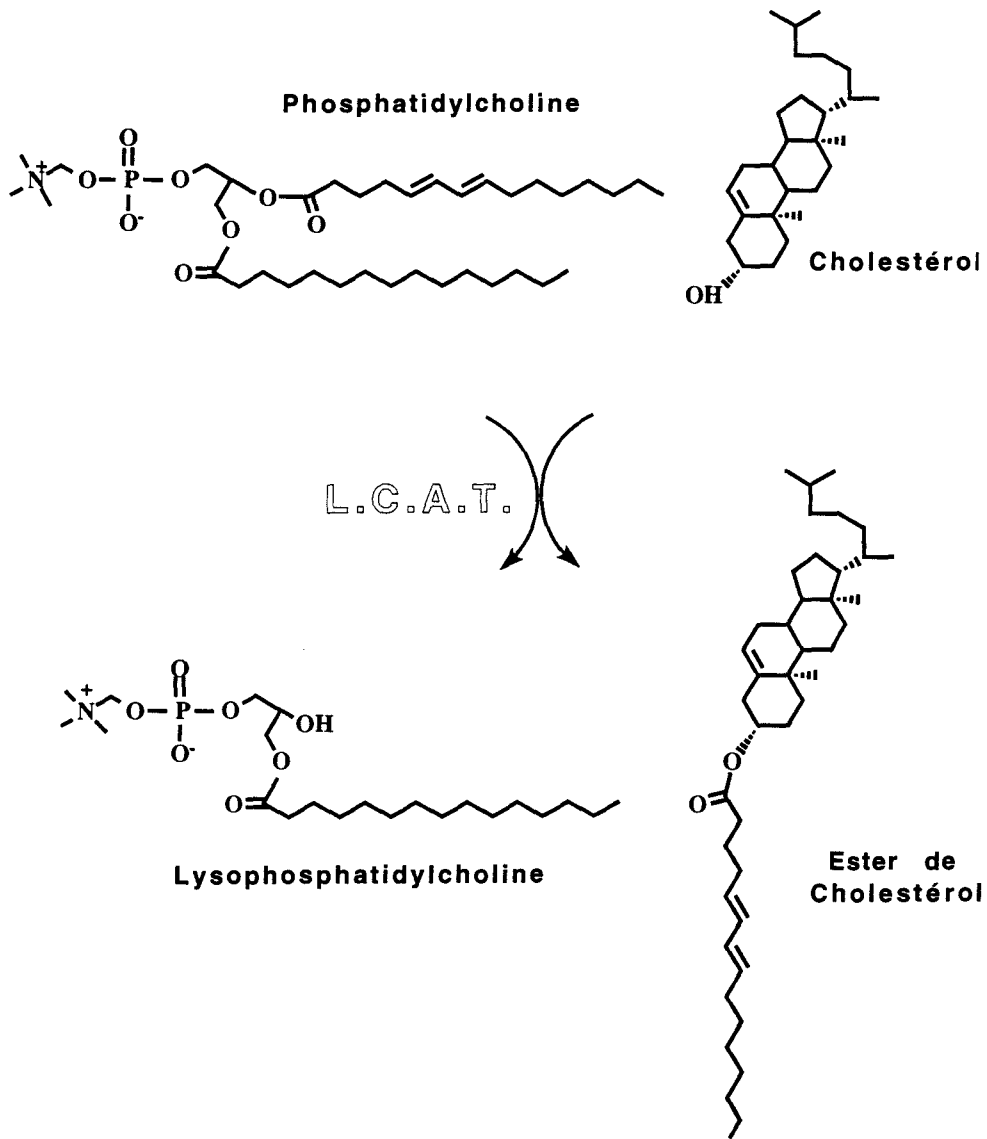


Figure 4. Estérification du cholestérol par la LCAT.

- La Protéine de transfert des phospholipides (PLTP).

Très récemment, le cDNA d'une autre protéine de transfert, la PLTP, a été cloné à partir d'une banque de cellules endothéliales<sup>58</sup>. Cette protéine possède une homologie de séquence avec la CETP (25%) et serait à l'origine de la conversion de HDL de petite taille en particules de taille plus importante, avec libération concomitante d'apoA-I<sup>59</sup>.

### 3. CLASSIFICATION DES HDL

#### 3.1. Classification selon Gofman et coll.<sup>60</sup>

De nombreuses études suggèrent qu'il existe plusieurs classes différentes d'HDL. Dans les années 50, Gofman et coll.<sup>60</sup> ont utilisé la classification usuelle des lipoprotéines, basée sur leur densité pour séparer les HDL en 3 populations distinctes : HDL<sub>1</sub>, HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>. Les propriétés physico-chimiques et la composition moyenne de ces différentes sous-classes<sup>29</sup> sont résumées dans le **tableau 4**.

**Tableau 4. Composition moyenne et propriétés physico-chimiques des différentes sous-classes de lipoprotéines de haute densité<sup>29</sup>.**

Lipoprotéines	Taille (nm)	Masse (kDa)	Composition (% en masse de lipoprotéines)				
			Protéine*	TG	PL	C	CE
HDL <sub>1</sub>	13	400	35	1	34	10	20
HDL <sub>2</sub>	10	250	42	5	35	5	13
HDL <sub>3</sub>	8	180	56	3	23	3	15
VHDL	7	150	72	1	20	2	5

\* La composition protéique inclut celle des glycanes.

- HDL<sub>1</sub> (d < 1,125) : cette appellation désigne une sous-classe d'HDL riche en apo E qui a été mise en évidence dans le plasma humain<sup>61,62</sup> et qui est présente en grande quantité chez le rat<sup>63</sup>. Les lipoprotéines appartenant à cette sous-classe possèdent un diamètre qui varie entre 12 et 14 nm et une masse moléculaire moyenne proche de 400 kDa. Elles sont riches en esters de cholestérol (**tableau 4**).

- HDL<sub>2</sub> ( $d < 1,125$ ) : cette appellation détermine une sous-classe d'HDL dont le diamètre atteint 10 nm et dont la masse moléculaire est proche de 280 kDa. Produit de la maturation plasmatique des HDL<sub>3</sub>, cette sous-classe est riche en esters de cholestérol et peut s'enrichir en triglycérides sous l'action de la CETP.

- HDL<sub>3</sub> ( $1,125 < d < 1,210$ ) : cette appellation détermine une sous-classe d'HDL d'un diamètre plus réduit que les HDL<sub>2</sub> (8 nm) qui atteignent 180 kDa.

- VHDL ( $1,210 < d < 1,250$ ) : les VHDL sont des HDL très denses dont la taille n'excède pas 7 nm et dont la masse moyenne est de 150 kDa.

### 3.2. Classification selon Alaupovic et coll.<sup>64</sup>

Bien que la classification selon Gofman<sup>60</sup> soit encore très souvent utilisée dans la littérature, elle ne tient pas compte de l'importance des apolipoprotéines qui sont indispensables à l'organisation, à la sécrétion et au métabolisme des lipoprotéines. C'est pourquoi Alaupovic et coll.<sup>64</sup> ont proposé en 1980 un nouveau concept de classification basée sur la composition en apolipoprotéines des lipoprotéines. Depuis, d'autres auteurs<sup>8</sup> ont montré que les apolipoprotéines, en raison de leur spécificité chimique et immunologique, peuvent servir de marqueurs pour la caractérisation des différentes lipoprotéines. L'obtention d'anticorps spécifiques de chaque apolipoprotéine a permis la caractérisation immunologique des lipoprotéines. De ce point de vue, les lipoprotéines peuvent donc être considérées comme un mélange de particules hétérogènes présentant une composition protéique définie. Suivant la classification d'Alaupovic, on définit :

- des particules simples, formées de lipides associés à une seule apolipoprotéine. C'est le cas de la LpA-I qui ne contient que l'apoA-I comme apolipoprotéine.

- des particules complexes, composées de lipides associés à deux ou plusieurs apolipoprotéines. C'est le cas, par exemple des LpA-I:A-II ou des LpA-I:A-II:E.

Les HDL sont donc ainsi définies qualitativement en fonction de leur contenu protéique. Bien qu'elles soient en perpétuel remaniement en raison des échanges permanents

d'apolipoprotéines qui s'exercent entre elles, on distingue deux classes principales de HDL qui peuvent être séparées par des techniques d'immuno-affinité :

- les particules contenant de l'apoA-I mais pas d'apoA-II : les LpA-I.
- les particules contenant de l'apoA-I et de l'apoA-II : les LpA-I:A-II.

Ainsi, environ un tiers de l'apoA-I plasmatique se trouve dans les particules LpA-I associées à d'autres apolipoprotéines minoritaires telles que les apo C, D, E et A-IV ainsi qu'à des protéines enzymatiques ou de transfert comme la LCAT<sup>65</sup> ou la CETP<sup>66</sup>. Les deux tiers restant se retrouvent dans les particules LpA-I:A-II, celles-ci sont aussi associées à des apolipoprotéines mineures. Au sein des LpA-I:A-II, le rapport molaire apoA-I/apoA-II est variable puisque l'apoA-II, plus hydrophobe, est capable de déplacer l'apoA-I sur les HDL<sup>67</sup>. Selon différentes études<sup>68.69</sup>, ce rapport varierait de 1,2 à 1,9.

### 3.3. Les particules pré-β

Soumise à une électrophorèse en gel d'agarose, la majorité des HDL migre avec une mobilité  $\alpha$ . Cependant, une petite fraction, représentant 2 à 5 % des HDL totales, se caractérise par une migration électrophorétique lente (pré-β). Cette fraction est d'ailleurs hétérogène<sup>70</sup> et 3 sous-fractions désignées pré-β1, pré-β2, et pré-β3 ont été obtenues par réalisation d'une seconde électrophorèse non dénaturante en gradient de polyacrylamide. Ces 3 sous-fractions contiennent toutes de l'apoA-I et pas d'apoA-II et diffèrent par leur masse moléculaire (respectivement 71, 325 et plus de 325 kDa) et par leur contenu en lipides. De plus, les particules de plus grande taille (pré-β3) contiendraient de la LCAT, de la CETP et de l'apo D.

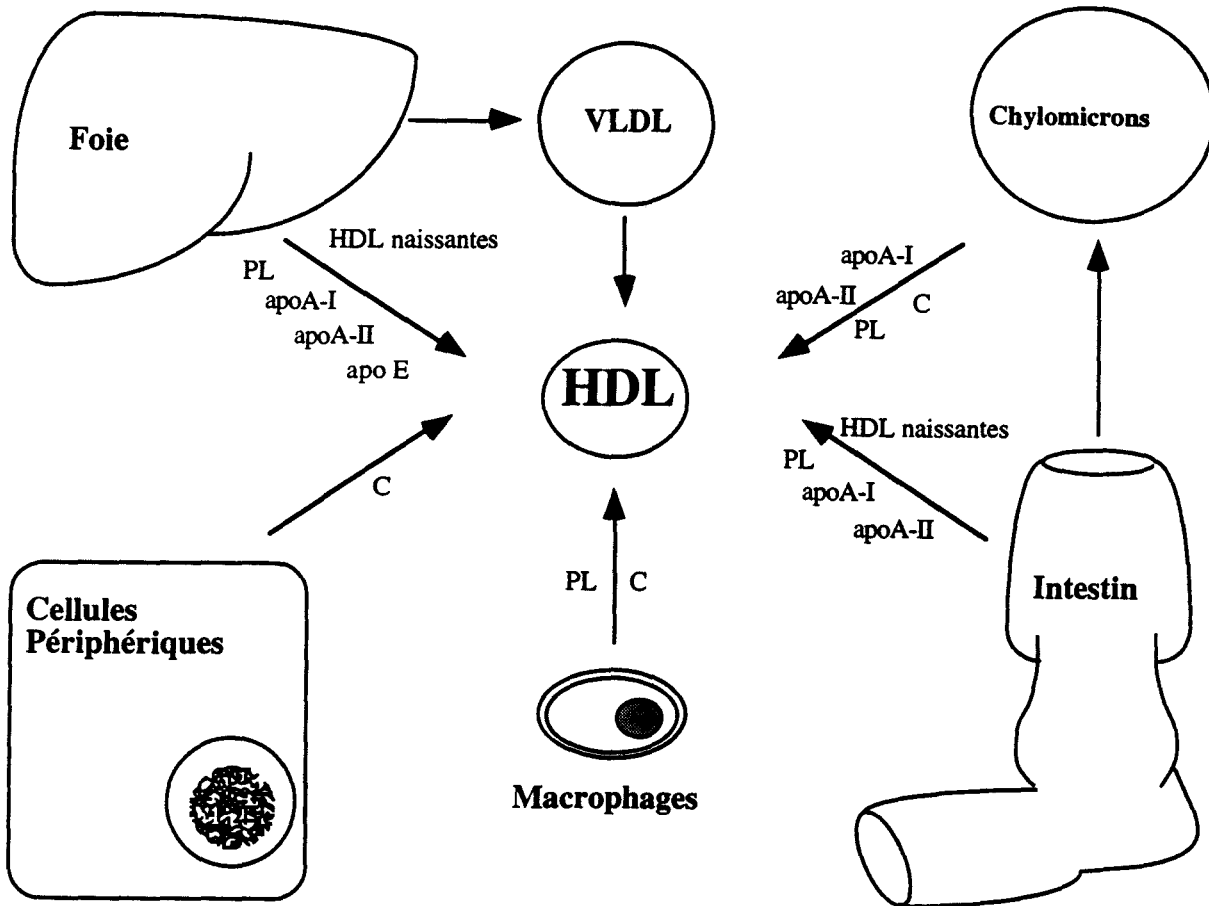
## 4. METABOLISME DES LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE

### 4.1. Origine des HDL

Les HDL sont constituées d'un mélange hétérogène de composés divers provenant :

- de la sécrétion directe par le foie ou l'intestin,
- du transfert d'autres lipoprotéines,
- des tissus périphériques (extra-hépatiques),
- de l'interaction directe phospholipides-apolipoprotéines.

L'origine des HDL et de leurs différents constituants est résumée sous la forme d'un schéma<sup>71</sup> sur la **figure 5**.

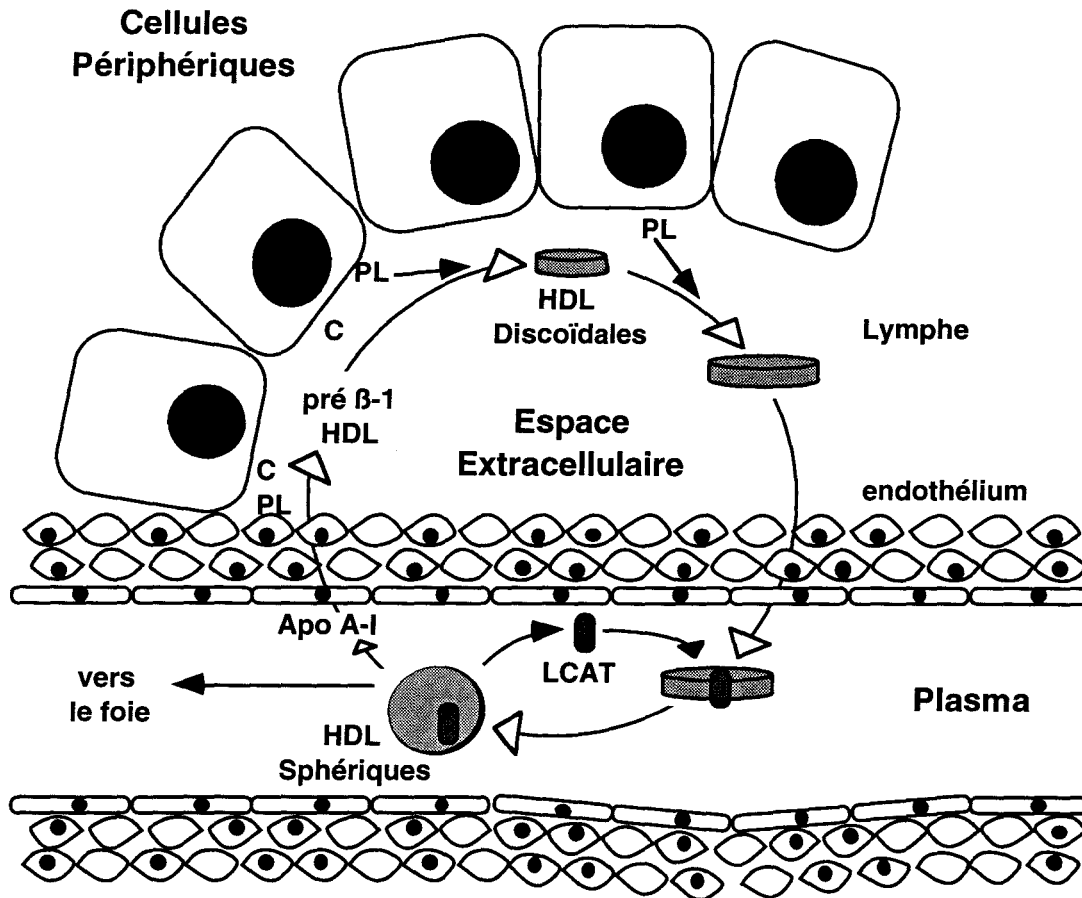


**Figure 5. Origine des HDL.**  
PL : phospholipides, C : cholestérol.

- Sécrétion directe ou indirecte par l'intestin.

En période de jeûne, l'intestin est capable de sécréter directement des HDL discoïdales de petite taille (HDL naissantes) contenant de l'apoA-I. Ces particules, constituées d'une double couche de phospholipides entourée par les apolipoprotéines et contenant éventuellement du cholestérol, évolueront ensuite vers une structure sphérique sous l'action de la LCAT. En période post prandiale, l'apoA-I est véhiculée par l'intermédiaire des Chylomicrons<sup>72</sup>. Sous

l'effet de la lipolyse, les apolipoprotéines A-I se détachent des Chylomicrons en emportant des phospholipides pour former des HDL discoïdales.



**Figure 6. Synthèse de HDL discoïdales dans le liquide interstitiel.**  
PL : phospholipides, C : cholestérol, LCAT : lécithine cholestérol acyl transférase.

- Sécrétion directe ou indirecte par le foie.

Le foie est capable, comme l'intestin, de sécréter directement des HDL discoïdales de petite taille (HDL naissantes) riches en apoA-I et apo E<sup>73</sup>. L'interaction de ce type de particule avec la LCAT induit la transformation progressive de ces HDL vers une structure sphérique. Lors de ce processus de maturation des HDL, l'apoA-I est retenue dans la particule tandis que l'apo E est perdue au profit de lipoprotéines de densité plus faible.

Le foie intervient également au niveau de la synthèse des VLDL qui sont composées en particulier d'apo C, de phospholipides et de cholestérol libre. Ces lipoprotéines de très basse



densité sont capables lors de leur lipolyse de fournir ces différents composants aux HDL, et de participer ainsi à la maturation des HDL plasmatiques.

- Interaction directe phospholipides-apolipoprotéines.

Une troisième voie de formation des précurseurs des HDL a été tout récemment avancée par Hara et Yokoyama<sup>74</sup>. Selon ces auteurs, les apolipoprotéines libres de la lymphe seraient capables d'interagir directement avec les phospholipides de la membrane cellulaire de macrophages pour donner des HDL naissantes. Celles-ci auraient une structure discoïdale qui évoluerait très peu dans le système lymphatique en raison de la faible activité d'estérification du cholestérol par la LCAT dans cet environnement<sup>75</sup>. Cette voie est également proposée par l'équipe de Fielding<sup>76</sup> qui estime que les particules pré- $\beta$ 1 constituent les véritables précurseurs des HDL discoïdales dans le liquide interstitiel (**figure 6**).

#### 4.2. Le transport inverse du cholestérol

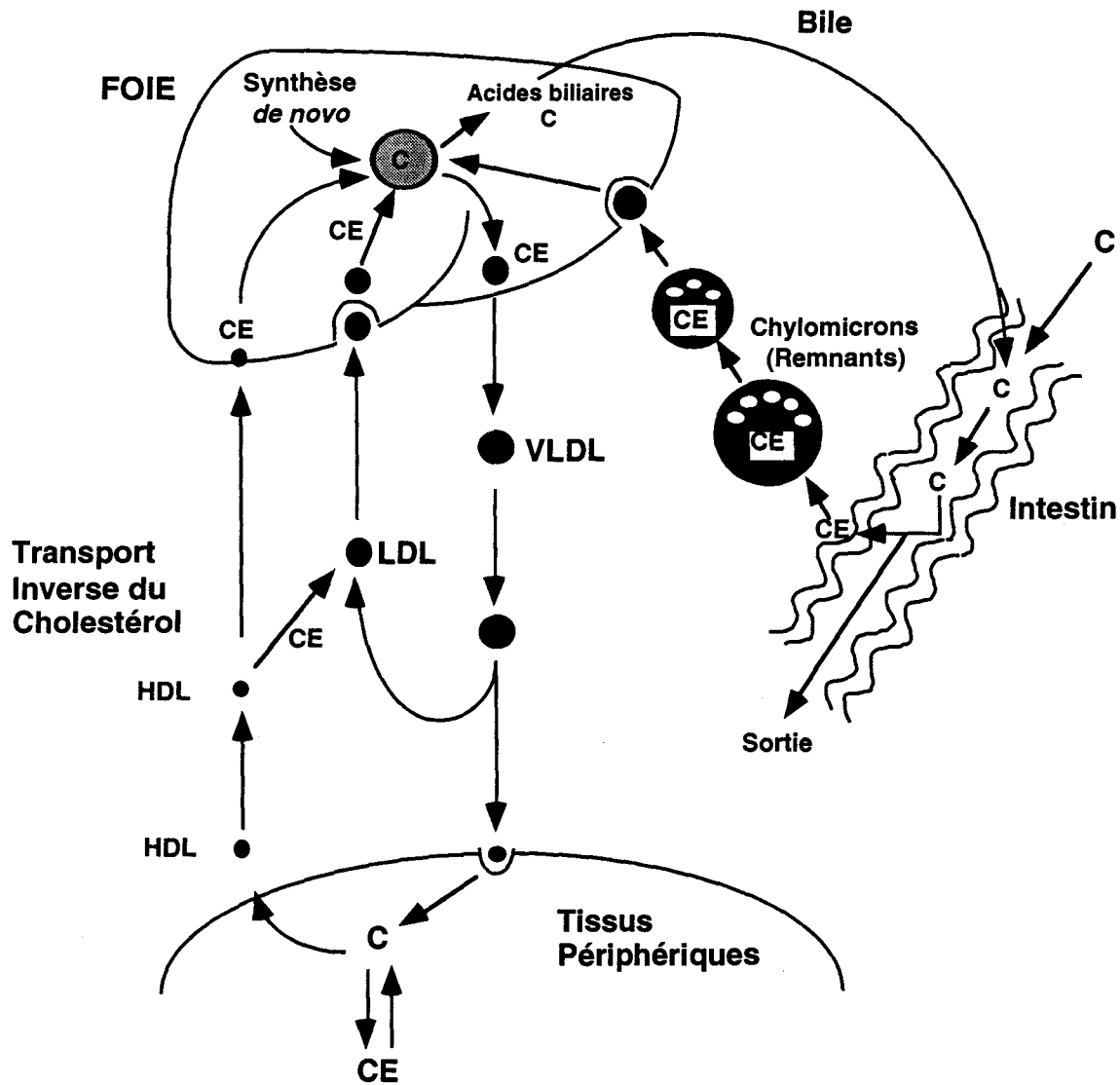
L'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer les propriétés anti-athérogènes des lipoprotéines de haute densité est leur implication dans un processus d'épuration du cholestérol intracellulaire des cellules périphériques : le transport inverse du cholestérol. Ce mécanisme vérifié *in vitro*, mais faiblement argumenté *in vivo*, pourrait intervenir en amont de la formation de la plaque d'athérome en diminuant le risque de surcharge en cholestérol des cellules périphériques, voire, pour certains auteurs, au niveau de la plaque d'athérome elle même.

Les cellules périphériques (non hépatiques) ont à leur disposition deux sources différentes d'apport de cholestérol :

- une source endogène de stérols issus de la combinaison de synthèses locales.
- un apport exogène de stérols dispensés par les LDL et les VLDL.

Pris en charge par les HDL, le cholestérol est amené au foie où il peut être recyclé sous une forme combinée à d'autres lipoprotéines (VLDL), mais une partie réapparaît dans la bile sous la forme de cholestérol non estérifié ou, après dégradation, sous forme d'acides biliaires. Lors de la digestion des graisses, ce cholestérol biliaire, réabsorbé par l'intestin, est relargué dans la lymphe intestinale avec du cholestérol exogène et réapparaît ensuite dans les

Chylomicrons. Les produits de la lipolyse de ces Chylomicrons contiennent encore la majorité de ces stérols qui sont rapidement clarifiés par le foie, redevenant une nouvelle fois disponibles pour le métabolisme cellulaire ou le recyclage lipoprotéique. Les principales voies de transport du cholestérol entre le foie et les autres tissus<sup>66</sup> sont schématisées sur la **figure 7**.



**Figure 7. Principales voies d'échanges du cholestérol entre le foie et les autres tissus.**  
 PL : phospholipides, C : cholestérol, CE : cholestérol estérifié, VLDL : lipoprotéine de très basse densité.

Sans apport d'énergie, la concentration du cholestérol dans les différents tissus et dans les lipoprotéines pourrait atteindre un état d'équilibre. Le cholestérol continuerait en effet à

s'échanger entre les différents *pools*, mais il n'y aurait pas de transport net entre eux. Il est maintenant tout à fait établi que divers mécanismes de transport actif perturbent ce simple équilibre *in vivo*. L'apport de cholestérol aux cellules par des mécanismes d'endocytose via un récepteur est un premier exemple de ce genre de processus biologique qui déséquilibre l'homéostasie du cholestérol. La synthèse *de novo* du cholestérol en est un autre

Le transport inverse constitue donc une voie d'épuration du cholestérol intracellulaire des cellules périphériques. C'est un mécanisme complexe, compartimenté et faisant intervenir de nombreuses protéines. Chronologiquement, on peut séparer ce processus biologique en 4 étapes :

- L'efflux de cholestérol.
- L'estérification du cholestérol par la LCAT.
- L'étape d'échange du cholestérol estérifié par la CETP.
- La prise en charge du cholestérol estérifié par le foie.

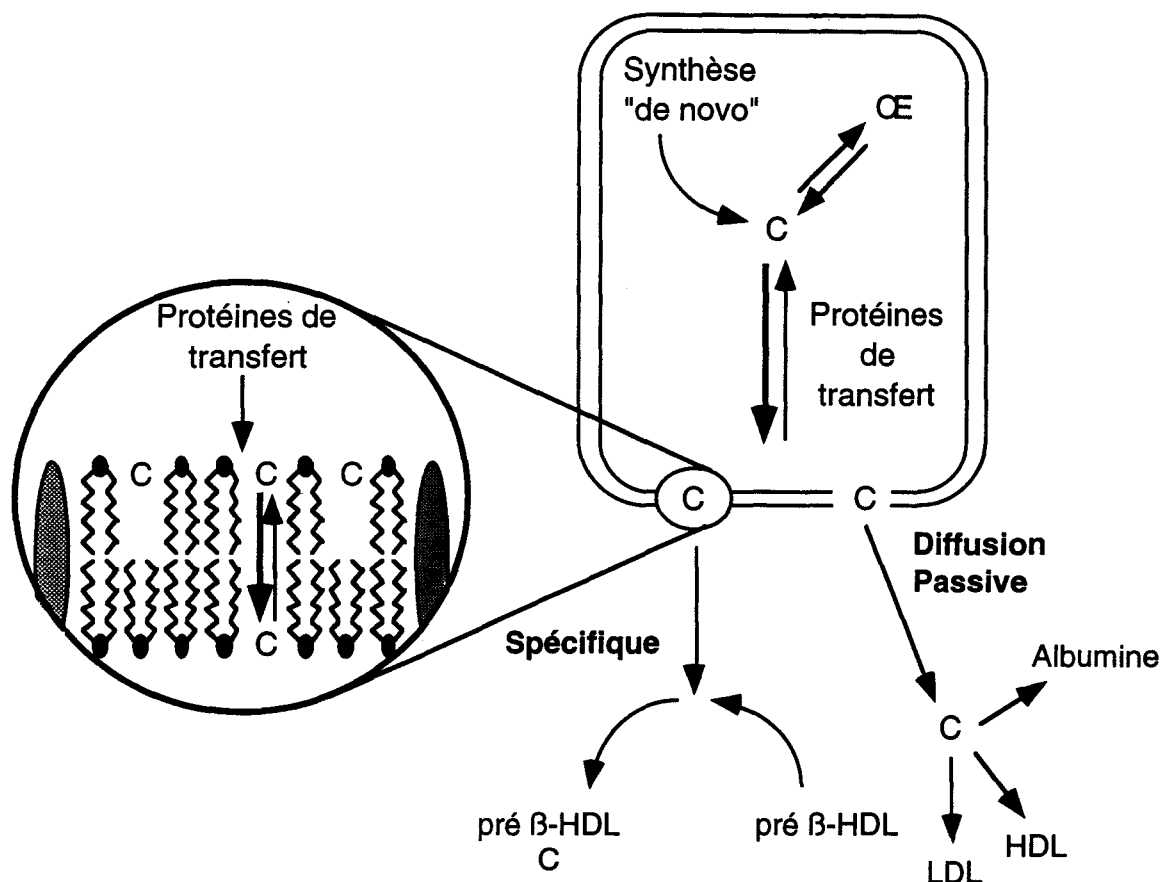
#### 4.2.1. L'efflux de cholestérol

Les tissus périphériques impliqués dans le transport inverse transfèrent leur cholestérol depuis la membrane cellulaire vers les HDL sous la forme non estérifiée. Cette étape initiale d'élimination du cholestérol est appelée efflux du cholestérol. Bien que le cholestérol des HDL ne représente que le quart de la quantité totale du cholestérol plasmatique, il a été démontré qu'une grande partie du cholestérol des cellules périphériques est initialement transférée vers les HDL<sup>77</sup>.

Le cholestérol sous sa forme non estérifié n'est pas distribué de façon symétrique au sein de la membrane plasmique des cellules. Sa distribution au niveau des feuillet interne et externe de la membrane varie suivant la composition en acides gras de la membrane et les têtes polaires des phospholipides qui la composent<sup>78</sup>. D'autre part, les lipides ne sont pas repartis de façon statistique au sein de la membrane cellulaire. En effet, de nombreuses études plaident pour la présence simultanée de micro-domaines lipidiques de composition différente dans les membranes biologiques<sup>79,80</sup>. En particulier, de nombreuses preuves rassemblées par Schroeder et coll.<sup>81</sup> démontrent l'existence de micro-domaines isolés, riches en cholestérol, au sein de la membrane plasmique de certaines cellules, présageant la complexité cinétique de l'efflux des stérols membranaires. Par ailleurs, la présence ou non de protéines membranaires influence également la composition en stérols de la membrane<sup>82</sup>. Enfin, le transport de lipides par l'intervention de protéines intracellulaires, telles que la *liver-fatty acid binding protein*<sup>83</sup> (L-FABP) ou la *sterol carrier protein*<sup>81</sup> (SCP-2), vers la membrane plasmique est également un

facteur pouvant être à l'origine d'une modification locale de la distribution du cholestérol membranaire et, par conséquent, susceptible de modifier la cinétique de l'efflux.

Deux hypothèses différentes<sup>76</sup> (figure 8) sont avancées pour expliquer le mécanisme de l'efflux de cholestérol : l'une est basée sur une diffusion passive du cholestérol, l'autre sur un processus dépendant d'un récepteur.



**Figure 8 : Un modèle d'efflux de cholestérol selon deux mécanismes.**  
 C : cholestérol, CE : cholestérol estérifié, LDL : lipoprotéine de haute densité.

- Mécanisme diffusionnel du cholestérol

Le transfert de cholestérol entre vésicules unilamellaires de phospholipides est de manière évidente un mécanisme diffusionnel<sup>84</sup> et, bien que la solubilité du cholestérol dans l'eau soit limitée, sa diffusion aqueuse doit également participer à l'efflux total de la membrane cellulaire. Ce mécanisme diffusionnel passe par deux étapes distinctes et successives : la désorption d'une molécule de cholestérol de la membrane plasmique, suivie de la diffusion aqueuse passive de cette molécule à travers la couronne aqueuse située à la périphérie de la membrane<sup>85,86</sup>. La question est de savoir si cette diffusion intervient pour la totalité de l'efflux ou pour une part

seulement. De récentes données cinétiques concernant l'efflux de cholestérol sur plusieurs types cellulaires reflètent l'existence de multiples *pools* de cholestérol au sein de la membrane plasmique (**tableau 5**).

**Tableau 5. Distribution du cholestérol dans les différents *pools* cinétiques de la membrane plasmique de différents types cellulaires**

Cellules	Méthode <sup>(a)</sup>	Taille des <i>pools</i> (%)		
		P1 <sup>(b)</sup>	P2 <sup>(b)</sup>	P3 <sup>(b)</sup>
L cell (fibroblastes)	analogue	14	76	10
Fu5AH (hépatômes)	isotope		50	50
J774 (macrophages)	isotope		15	85
Cellules musculaires lisses	isotope		0	100

(a) Les cinétiques ont été déterminées en utilisant soit le déhydroergostérol (analogue fluorescent du cholestérol), soit du cholestérol marqué.

(b) P1 : *pool* rapide d'échange de cholestérol ( $t^{1/2} = 20$  min), P2 : *pool* intermédiaire d'échange ( $t^{1/2} = 2$  h), P3 : *pool* d'échange très lent ( $t^{1/2} = 15-25$  h).

Ce déséquilibre dans la composition membranaire ne peut s'expliquer en terme de diffusion que par l'existence de taux de désorption différents au sein de la membrane plasmique induits par une régulation dynamique de la concentration en cholestérol dans des micro-domaines membranaires. Un élément de réponse possible se trouve dans des expériences d'addition d'un transporteur intracellulaire de stérol (SCP-2) à des préparations de membranes cellulaires<sup>81</sup>. Cette étude montre une augmentation significative de l'efflux en présence de la protéine de transport. Ce résultat doit être relativisé car bien qu'une autre protéine de transfert de lipides (L-FABP) induise une augmentation de la concentration en cholestérol du feuillet externe de la membrane<sup>83</sup>, aucune augmentation d'efflux n'a pu être mise en évidence en présence de celle-ci.

Les partisans de cette hypothèse ont longtemps pensé que la diffusion aqueuse du cholestérol ne nécessitait aucune interaction entre les HDL et la membrane cellulaire. Cependant, très récemment des comparaisons de vitesses maximales d'efflux induits par des particules contenant ou ne contenant pas d'apolipoprotéines montrent que l'efflux de cholestérol vers les HDL passe par un mécanisme beaucoup plus complexe que la simple diffusion aqueuse<sup>87</sup>. Les données présentées dans cette étude sont en faveur d'une interaction des HDL avec la membrane plasmique qui permettrait d'augmenter le taux de désorption du cholestérol de la surface cellulaire.

Rothblat et coll.<sup>88</sup> proposent qu'au niveau de domaines membranaires faiblement pourvus en cholestérol (*pools* rapides), les HDL interagissent avec la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'une région flexible et accessible de l'apolipoprotéine A-I<sup>89</sup>. Ce domaine ne participerait pas à l'interaction avec les chaînes alkyles des phospholipides au sein des disques de petite taille et serait disponible pour interagir directement avec la membrane cellulaire. Ce type d'interaction membranaire serait beaucoup moins fort qu'une interaction ligand-récepteur classique et serait plus en rapport avec le type de fixation des HDL constatée par Tabas et Tall<sup>90</sup> ou plus récemment par Leblond et Marcel<sup>21</sup>. Cependant, la physiologie moléculaire d'une telle interaction n'est pas encore clairement définie. Pour Rothblat et coll.<sup>88</sup>, l'efflux dans les domaines riches en cholestérol serait en revanche indépendant de la lipoprotéine acceptrice et consisterait en une diffusion passive du cholestérol dans l'environnement externe aqueux de la membrane où il serait capté par la particule (HDL ou LDL) ou par de l'albumine. Cette hypothèse a toutefois été mise en doute récemment par Fielding et Fielding<sup>91</sup> dont les travaux suggèrent l'existence d'un efflux spécifique, HDL-dépendant, dans des régions riches en cholestérol : les cavéoles.

- Mécanisme récepteur-dépendant

Dans la seconde hypothèse, l'efflux de cholestérol serait la conséquence d'un signal intracellulaire passant par la protéine kinase C après la fixation des HDL sur une protéine de surface membranaire<sup>92,93</sup>. Le cholestérol est transféré à la surface cellulaire depuis un *pool* de cholestérol nouvellement synthétisé dans le réticulum endoplasmique. Ce phénomène a principalement été mis en évidence sur des cellules chargées en lipides telles que les adipocytes ou les cellules spumeuses. Les cellules périphériques telles que les fibroblastes, lorsqu'elles ne sont pas pré-chargées en cholestérol, ne semblent pas utiliser ce type de mécanisme pour l'efflux de cholestérol ou alors en très faible proportion. La contribution d'un efflux induit par un signal intracellulaire dans les cellules non chargées (représentant la vaste majorité des cellules périphériques *in vivo*) est donc probablement très faible.

En définitive, il semble qu'aucune des deux hypothèses ne suffisent à elles seules à expliquer, de façon pleinement satisfaisante, la spécificité de l'efflux pour les HDL. On considère de plus en plus que les 2 mécanismes puissent co-exister : un efflux diffusionnel non spécifique et un efflux actif pour lequel l'apoA-I jouerait un rôle important. Il semble, en effet, que les particules contenant de l'apoA-I<sup>94</sup>, et principalement les particules pré  $\beta$ -1, soient des accepteurs préférentiels pour l'efflux actif<sup>95</sup>. L'importance de l'apoA-I est d'ailleurs renforcée par des études d'efflux réalisées sur du plasma dépourvu d'apoA-I après chromatographie d'affinité. Comparativement au plasma non traité, l'efflux de cholestérol est, dans ces

conditions, diminué de moitié<sup>96</sup>, l'autre moitié correspondant apparemment à un efflux albumino-dépendant. En effet dans le plasma natif, l'albumine semble jouer un rôle important pour la composante diffusionnelle de l'efflux. Son petit diamètre, en comparaison à la plupart des lipoprotéines plasmatiques, et sa capacité à complexer le cholestérol en font un candidat intéressant d'accepteur initial du cholestérol diffusant dans la phase aqueuse enveloppant la membrane cellulaire. A partir de ce complexe, le cholestérol pourrait ensuite diffuser vers d'autres lipoprotéines telles que HDL ou LDL.

Ainsi, deux composantes différentes sont maintenant envisagées pour l'efflux de cholestérol. Les caractéristiques permettant de différencier les efflux spécifiques et diffusionnels<sup>76</sup> sont résumées dans le **tableau 6**. A la différence de l'efflux diffusionnel, l'efflux actif est sensible à l'action des protéases<sup>96</sup>. D'autre part, l'activité de cet efflux est peut être dépendant de la présence de protéines intracellulaires de transfert de lipides comme la SCP-2 ou la L-FABP, capables de modifier et de réguler les *pools* de cholestérol membranaire disponible pour ce type d'efflux. En revanche, il est établi que l'efflux actif peut être modifié par le taux d'activité de la LCAT<sup>70</sup> contrairement à la composante diffusionnelle de l'efflux qui est indépendante de l'activité LCAT.

**Tableau 6. Caractéristiques de l'efflux de cholestérol spécifique (HDL-dépendant) et diffusionnel (HDL-indépendant).**

$t^{1/2}$  : Temps de demi-vie du cholestérol membranaire.

Efflux spécifique	Efflux diffusionnel
Efflux rapide ( $t^{1/2} \approx 1$ h).	Efflux lent ( $t^{1/2} \approx 10$ h).
Sensible aux protéases.	Résistant aux protéases.
Niveaux d'HDL pré- $\beta$ 1 constants.	Niveaux d'HDL pré- $\beta$ 1 non constants.
Lié à l'activité de la LCAT.	Indépendant de la LCAT.

#### 4.2.2. Estérification du cholestérol

La conversion dans le plasma des HDL naissantes discoïdales par la LCAT constitue un élément important du métabolisme plasmatique des HDL. Elle a été mise en évidence *in vivo* chez des patients présentant une déficience en LCAT<sup>97</sup> et également *in vitro* par utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme<sup>98</sup>. Dans les deux cas, on constate l'apparition de particules discoïdales riches en phospholipides et en cholestérol non estérifié, contenant de l'apoA-I.

L'action de la LCAT provoque un changement dans la localisation du cholestérol au sein des HDL discoïdales. L'enzyme catalyse, en effet, le transfert d'un acide gras d'une lécithine vers l'hydroxyle d'une molécule de cholestérol en donnant une lysolécithine et un ester de cholestérol (voir figure 4). La polarité des produits obtenus à l'issue de l'intervention de l'enzyme diffère fondamentalement de celle de leurs précurseurs. Les molécules d'esters de cholestérol produites, plus hydrophobes que leurs homologues non acylées, vont migrer vers l'intérieur de la particule pour former un coeur hydrophobe. La surface laissée vacante peut alors à nouveau être occupée par une autre molécule de cholestérol libre qui pourra à son tour subir l'action de l'enzyme. La lysolécithine produite présente, en revanche, une hydrophobicité inférieure aux lécithines. C'est pourquoi, ces molécules se dissocient de la lipoprotéine pour être libérées dans le plasma, où elles s'associent à l'albumine. La résultante physico-chimique de ce processus biologique est l'évolution progressive de la structure discoïdale initiale des HDL naissantes vers des particules riches en esters de cholestérol de structure pseudo-micellaire sphérique.

#### **4.2.3. Echange du cholestérol estérifié**

La protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) réalise l'échange d'une partie des esters de cholestérol des HDL sphériques contre des triglycérides qui sont acquis au dépend des lipoprotéines de basse densité ou de leurs remnants. C'est la partie C-terminale de la CETP qui semble impliquée dans le mécanisme de prise en charge des esters de cholestérol et des triglycérides<sup>99</sup>. Dans le plasma, le transport des esters de cholestérol par la CETP dépend principalement de la disponibilité des particules acceptrices riches en triglycérides et non pas de la concentration plasmatique en CETP<sup>100.101</sup>.

#### **4.2.4. Clairance par le foie**

Quatre mécanismes différents semblent intervenir dans l'étape finale du transport inverse du cholestérol : la captation hépatique.

- Le transfert du CE vers les lipoprotéines de basse densité via la CETP permet une élimination du cholestérol par l'intermédiaire des récepteurs hépatiques<sup>102</sup>.



- Les HDL<sub>1</sub>, contenant de l'apo E prendraient la voie du récepteur B/E présent sur les hépatocytes pour être catabolisées après internalisation<sup>103</sup>.

- Les esters de cholestérol peuvent également être transférés directement des HDL au foie sans nécessité l'internalisation des particules et ce, par un phénomène de captation hépatique dans lequel le récepteur *scavenger* d'Acton et coll.<sup>104</sup> pourrait jouer un rôle important.

- La captation hépatique pourrait également faire intervenir un autre mécanisme récepteur-dépendant. En effet, d'autres sites de fixation de HDL ont été mis en évidence sur des hépatocytes de rat, de lapin, de porc et chez l'homme. Dans ces expériences, les HDL sont fixées, internalisées puis dégradées. Le ligand mis à contribution pour ces fixations spécifiques semble être l'apolipoprotéine A-I<sup>105.106</sup>. Cette hypothèse mérite cependant confirmation car Dashti et coll.<sup>107</sup> ont montré que sur la lignée humaine HepG2, le mécanisme d'interaction avec les HDL impliquerait plutôt les apo D et C.

## CHAPITRE II. STRUCTURE ET FONCTION DE L'APOLIPOPROTEINE A-I

L'apolipoprotéine A-I est l'apolipoprotéine majeure des lipoprotéines de haute densité. Elle constitue à elle seule 62 à 65% de la proportion protéique totale des HDL.

### 1. STRUCTURE DE L'APOLIPOPROTEINE A-I

#### 1.1. Structure primaire de l'apoA-I

1	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp	Asp	Arg
11	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp
21	Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val
31	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys
41	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp
51	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr	Phe	Ser	Lys	Leu
61	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu
71	Phe	Trp	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu
81	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys	Asp	Leu
91	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr
101	Leu	Asp	Asp	Phe	Gln	Lys	Lys	Trp	Gln	Glu
111	Glu	Met	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	Val	Glu
121	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala
131	Arg	Gln	Lys	Leu	His	Glu	Leu	Gln	Glu	Lys
141	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp
151	Arg	Ala	Arg	Ala	His	Val	Asp	Ala	Leu	Arg
161	Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp	Glu	Leu
171	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala
181	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Gly	Ala	Arg	Leu	Ala
191	Glu	Tyr	His	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	His	Leu
201	Ser	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Pro	Ala
211	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Leu	Pro
221	Val	Leu	Glu	Ser	Phe	Lys	Val	Ser	Phe	Leu
231	Ser	Ala	Leu	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Leu
241	Asn	Thr	Gln							

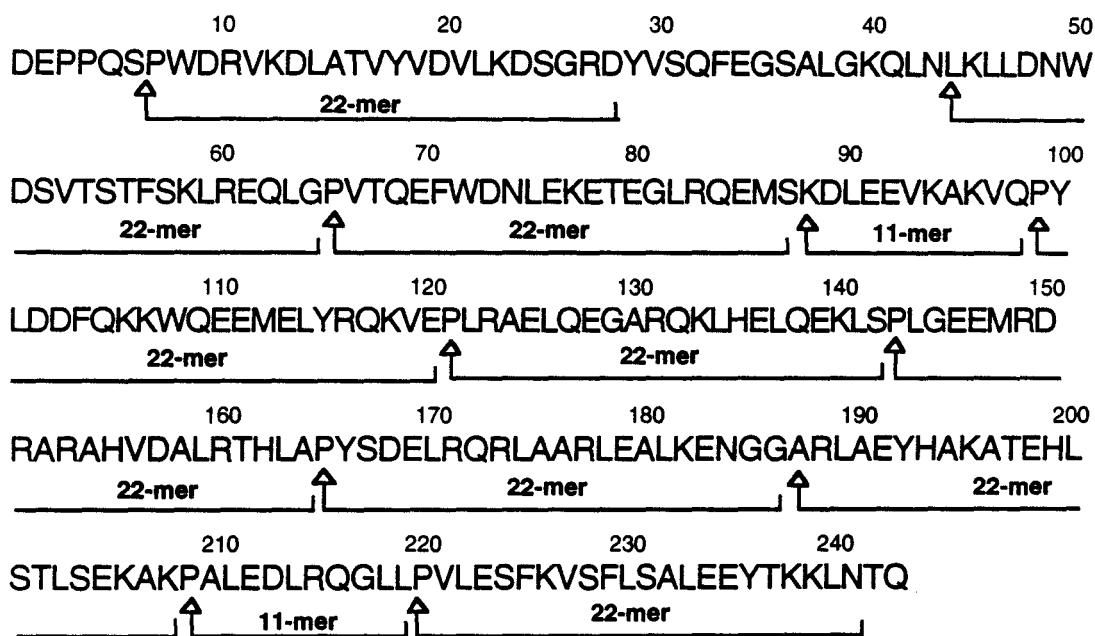
Figure 9. Séquence de l'apolipoprotéine A-I humaine en code 3 lettres des acides aminés<sup>108</sup>.

L'apolipoprotéine A-I mature est constituée d'une chaîne polypeptidique unique comprenant 243 résidus. Sa structure primaire (figure 9), déterminée par séquençage de la protéine purifiée, a été publiée par Brewer et coll.<sup>108</sup> en 1978. Elle ne contient pas de résidus cystéine ni d'isoleucine.

L'apoA-I est synthétisée sous la forme d'une préapoA-I comportant 24 acides aminés supplémentaires attachés à l'extrémité N-terminale de la protéine mature<sup>109</sup>. Comme de nombreuses protéines sécrétées, l'apoA-I possède, lors de sa traduction, un peptide signal de

18 acides aminés qui permet d'engager la proprotéine dans le lumen du réticulum endoplasmique. Ce peptide est clivé pour donner naissance à une proprotéine<sup>110</sup> contenant 249 acides aminés qui est libérée dans le plasma. La proportion de proapoA-I circulante représente 4% de la quantité total d'apoA-I plasmatique. Elle subit ensuite une maturation par clivage d'un segment de 6 acides aminés (R-H-F-W-Q-Q) à l'extrémité N terminale. Cette maturation s'effectue grâce à une enzyme de conversion qui n'a pas encore été isolée mais qui serait métallo-dépendante<sup>111</sup>. D'autres modifications covalentes post-traductionnelles de l'apoA-I comme la phosphorylation et myristoylation ont été décrites dans la littérature.

Les structures génomiques des apolipoprotéines échangeables présentent des similitudes très marquées<sup>112</sup>. Elles codent pour des répétitions successives de domaines longs de 22 acides aminés (22-mer), constituée chacune de tandems de 11 acides aminés (11-mer)<sup>113,114</sup>. Une étude de séquençage de DNA a confirmé l'existence d'une périodicité de 22-mer dans l'apoA-I<sup>53</sup>. Dans la majorité des cas, un résidu de proline constitue le point de départ de ces unités de répétitions (**figure 10**).



**Figure 10.** Analyse de la séquence de l'apolipoprotéine A-I humaine<sup>115</sup>. Les flèches indiquent le début des unités de répétition 11-mer et 22-mer .

## 1.2. Structures secondaire et tertiaire de l'apoA-I

A ce jour, aucune apolipoprotéine n'a pu être entièrement cristallisée. Seul un fragment de 22 kDa correspondant à l'extrémité N-terminale de l'apo E a pu être traité avec succès par cristallographie<sup>116</sup> et résolu par diffraction aux rayons X. En conséquence, les méthodes disponibles pour la détermination de la structure secondaire et la structure tertiaire des apolipoprotéines sont :

- Les algorithmes de prédictions de structure secondaire
- L'analyse spectroscopique (dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge)
- L'outil peptidique
- L'outil immuno-chimique

### 1.2.1. Analyse conformationnelle de la séquence

L'analyse de la séquence primaire de l'apoA-I suivant la méthode de prédiction de Chou et Fasman<sup>117</sup> est présentée sur la **figure 11a**. Cette analyse fait apparaître l'existence d'une répétition de régions  $\alpha$ -hélicoïdales séparées les unes des autres par de courts segments dont la structure la plus probable correspond à des coudes  $\beta$ . Cette proportion importante d' $\alpha$ -hélicité dans l'apoA-I est confirmée par l'analyse selon Garnier et coll.<sup>118</sup> (**figure 11b**).

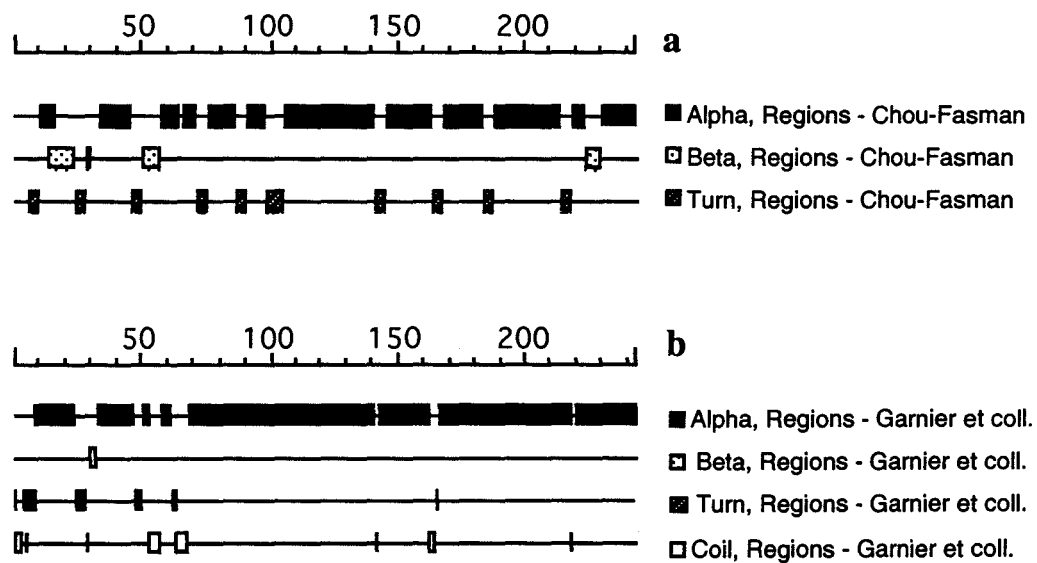


Figure 11. Analyse de la structure secondaire de l'apoA-I humaine par les méthodes de Chou et Fasman<sup>117</sup> (a) et Garnier et coll.<sup>118</sup> (b).








### 1.2.2. Une unité structurale : l'hélice amphipathique

Toute molécule présentant une distribution non aléatoire de groupements polaires et non polaires est qualifiée d'amphipathique, et peut être caractérisée en fonction de l'affinité dont elle fait preuve pour une interface lipide/eau. Certaines molécules comme les acides gras, les sels biliaries ou encore les apolipoprotéines échangeables (dont l'apoA-I) possèdent cette propriété. Sur la base de simples représentations de "Schiffer-Edmunson<sup>119</sup>" et de calculs de modélisation moléculaire, Segrest<sup>27</sup> propose pour la première fois en 1974 que le caractère amphipathique des apolipoprotéines échangeables et leur capacité à s'associer aux lipides proviennent d'un motif structural particulier : l'hélice  $\alpha$  amphipathique.

Les hélices amphipathiques ont tout d'abord été mises en évidence dans des protéines globulaires lors des premières élucidations de structures cristallines. Plus tard, le motif hélice amphipathique fût à nouveau rencontré dans de nombreux peptides ou protéines biologiquement actifs. En particulier, des domaines hélicoïdaux amphipathiques ont été décrits pour d'autres protéines ou peptides associés aux lipides tels que des polypeptides hormonaux, des venins, des antibiotiques et certains complexes protéiques transmembranaires. En se basant sur une analyse détaillée de leurs propriétés structurales et physico-chimiques, le groupe de Segrest propose de classer les hélices amphipathiques en 7 classes majeures (**tableau 7**) : A, H, L, G, K, C, M. Il a établi que la différence fondamentale qui existe entre les hélices amphipathiques des lipoprotéines échangeables (classe A) et celles rencontrées dans les autres protéines ou peptides est la distribution des résidus chargés sur la face polaire de l'hélice.

**Tableau 7. Classification et propriétés des principales classes d'hélices amphipathiques selon Segrest et coll<sup>120</sup>.**

Les résidus polaires sont représentés en noirs (chargés +) et gris clair (chargés -), les résidus apolaires en blanc.

Classes	A	H	L	G	K	C	M
	apolipo-protéines	hormones peptidiques	polypeptides lytiques	protéines globulaires	protéines kinases	super-hélices	protéines transmembranaires
représentation schématique							
moment hydrophobe moyen par résidu	0,42	0,54	0,37	0,13	0,38	0,22	0,12
angle moyen occupé par la face polaire	> 180	< 100	< 100	> 180	> 180	> 320	< 60
hydrophobicité moyenne par résidu (face apolaire)	0,73	0,57	0,74	0,64	0,55	0,80	0,74

### 1.2.3. Analyse spectroscopique de l'apoA-I

Les études de dichroïsme circulaire réalisées sur l'apoA-I libre en solution confirment les prédictions de structure secondaire obtenues avec les méthodes de Chou-Fasman<sup>117</sup> et Garnier et coll.<sup>118</sup>. En effet, elles mettent en évidence une proportion importante d' $\alpha$ -hélicité au sein de cette protéine (**tableau 8a**). On remarque que, bien que les valeurs obtenues soient très variables, la proportion d' $\alpha$ -hélicité est toujours majoritaire vis-à-vis des autres éléments de structure secondaire. Le pourcentage moyen d'hélice  $\alpha$  se situe aux alentours de 50%. Cette technique spectroscopique confirme donc bien la prépondérance hélicoïdale de l'apolipoprotéine A-I en solution. En présence de lipides, l'hélicité globale de la molécule augmente sensiblement pour atteindre une valeur moyenne de l'ordre de 65% d' $\alpha$ -hélicité (**tableau 8b**). Ces mesures démontrent que la conformation de l'apoA-I change lorsqu'elle s'associe aux lipides et que ce changement va dans le sens d'une structuration de la molécule s'exprimant par une augmentation de son  $\alpha$ -hélicité globale.

**Tableau 8. Pourcentages de structures secondaires de l'apolipoprotéine A-I en solution aqueuse (a) et complexée à des phospholipides au sein de HDL reconstituées (b) déterminés par dichroïsme circulaire.**

Les valeurs sont exprimées en %. CD: Dichroïsme circulaire,  $[\theta]_{222}$ : Ellipticité à 222 nm

(a)	Méthode utilisée	hélicité $\alpha$	feuillet $\beta$	coude $\beta$	Pelote statistique
Sparks et coll. <sup>121</sup>	CD-Compton <sup>(d)</sup>	49	6	17	28
Holvoet et coll. <sup>122</sup>	CD- $[\theta]_{222}$	48	-	-	-
Leroy et coll. <sup>123</sup>	CD- $[\theta]_{222}$	55	-	-	-
Fukushima et coll. <sup>124</sup>	CD- $[\theta]_{222}$	61	-	-	-

(b)	Méthode	hélicité $\alpha$	feuillet $\beta$	coude $\beta$	Pelote statistique
Sparks et coll. <sup>121</sup> (a)	CD-Compton <sup>(d)</sup>	58	5	8	29
Holvoet et coll. <sup>122</sup> (b)	CD- $[\theta]_{222}$	74	-	-	-
Wetterau et Jonas <sup>125</sup> (c)	CD- $[\theta]_{222}$	75	-	-	-
Jonas et coll. <sup>126</sup> (a)	CD- $[\theta]_{222}$	72	-	-	-

(a) HDL reconstituées avec du POPC, (b) HDL reconstituées avec du DMPC, (c) HDL reconstituées avec du DPPC.

(d) Pourcentages obtenus par la méthode de Compton et Johnson<sup>127</sup>.

La longueur d'onde correspondant à la fluorescence intrinsèque maximale des résidus de tryptophane permet d'obtenir des renseignements sur l'exposition de ces résidus vis-à-vis du solvant. Dans le cas de l'apoA-I, il y a 4 résidus de tryptophane qui sont situés à l'extrémité N-terminale de la molécule aux positions 8, 50, 72, et 108. L'équipe de Jonas<sup>126</sup> a montré que la fluorescence maximale de l'apoA-I en solution ( $\lambda_{ex} = 295$  nm) est émise aux environs de 335 nm. Cette mesure suggère que l'extrémité N-terminale de la molécule se trouve plutôt dans un environnement non polaire lorsque l'apoA-I est libre en solution. Cette valeur varie très peu ( $\pm 3$  nm) lorsque l'apoA-I est associée aux lipides (334 nm), ce qui indique que l'accessibilité globale au solvant de la partie N-terminale de l'apoA-I ne change pas en présence de lipides.

Récemment, une technique nouvelle, proposée par le groupe de M.C. Phillips<sup>121</sup> a permis l'exploration de la structure de l'apolipoprotéine A-I par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette méthode fait intervenir une étape de méthylation réductive spécifique des résidus de lysine en utilisant du formaldéhyde (HCHO) marqué au <sup>13</sup>C. La titration des résidus de lysine diméthylés suggère que l'apoA-I possède une conformation différente lorsqu'elle est libre en solution ou associée aux lipides. En effet, alors que 86% des résidus de lysine sont titrés de façon normale et semblent exposés au solvant lorsque l'apoA-I est libre en solution, cette proportion est sensiblement diminuée quand l'apoA-I est associée aux phospholipides ( $\approx 60\%$ ). Cette différence indiquerait un réarrangement de la conformation de l'apoA-I faisant intervenir des modifications d'interactions hélices-hélices ou lipides-hélices. Cette observation a récemment été confirmée<sup>128</sup> en utilisant cette même technique sur l'apoA-I libre en solution dans un mélange eau/n-propanol qui permet de mimer la conformation de la protéine associée aux lipides.

#### 1.2.4. Modélisation moléculaire

Afin d'analyser et de prédire la structure des hélices amphipathiques des apolipoprotéines, de nombreux outils de modélisation moléculaire ont été développés. Trois d'entre eux, particulièrement intéressants, sont abordés dans ce chapitre. Chacun d'eux envisage le problème de la modélisation de façon différente pour apporter des informations complémentaires quant à la structure secondaire et à la structure tertiaire de l'apoA-I. Le but commun de ces trois approches est de proposer un modèle structural global de l'apoA-I.

- Le programme du groupe de Segrest<sup>129</sup> de l'université d'Alabama (USA) constitue à l'origine un outil prédictif permettant d'identifier, à partir de la séquence primaire, les domaines d'une protéine ou d'un peptide capables de se replier en une hélice amphipathique et d'effectuer leur classement. Ainsi, 3 classes distinctes d'hélices amphipathiques ont été identifiées dans

l'apolipoprotéine A-I : la sous-classe G\*, la classe A et la classe Y (figure 12). Les 3 classes sont définies selon la distribution des charges et les tailles relatives des faces polaires et non-polaires de l'hélice (figure 13).

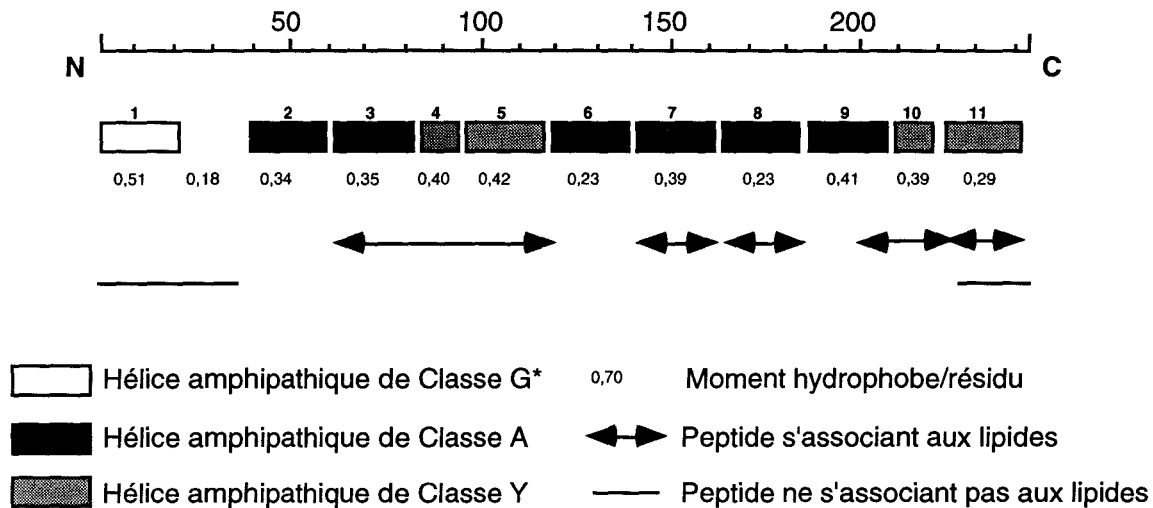


Figure 12. Répartition des 3 classes d'hélices amphipathiques (A, Y, G\*) au sein de l'apolipoprotéine A-I humaine<sup>130</sup>.

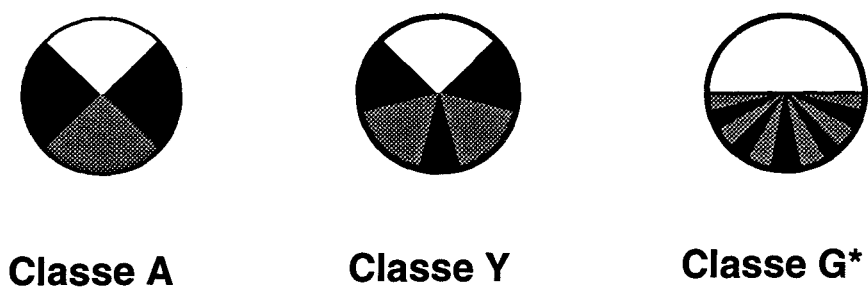
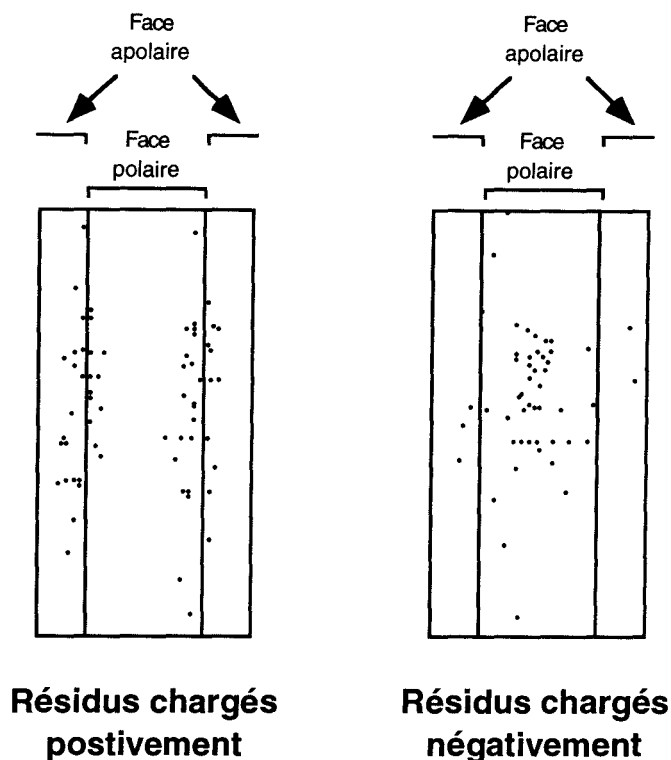


Figure 13. Distribution polaire/non polaire des trois classes d'hélices amphipathiques rencontrées dans les lipoprotéines échangeables selon Brouillette et coll.<sup>115</sup>.

Les hélices sont représentées en projection axiale avec, en blanc les résidus non polaires, en gris les résidus polaires chargés négativement, et en noir les résidus polaires chargés positivement.



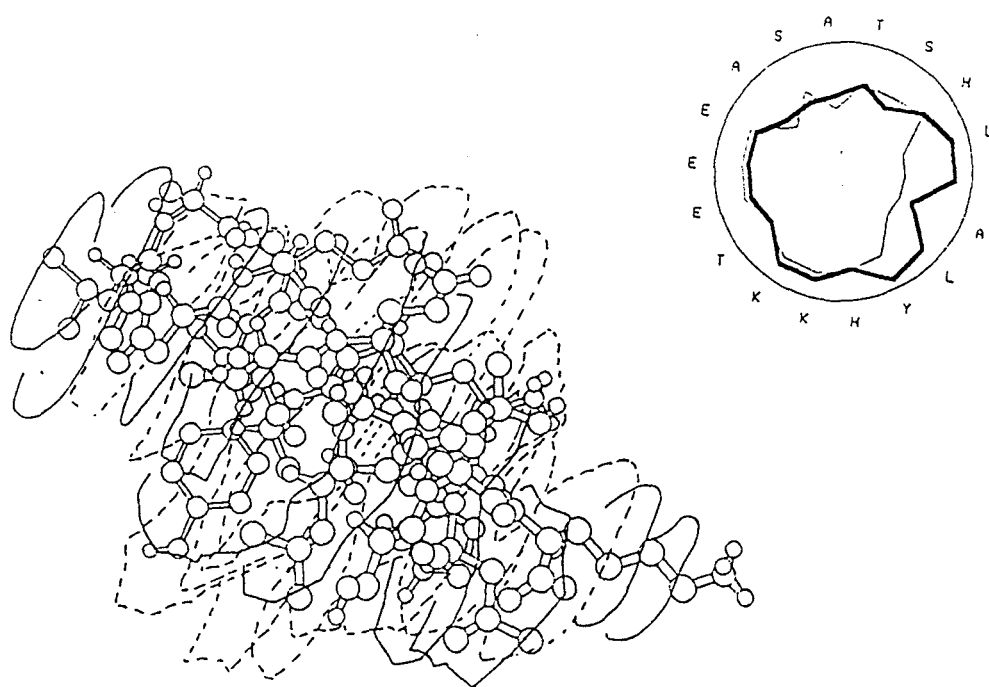


**Figure 14.** positions des résidus chargés et non chargés dans les hélices amphipathiques de classe A, analysées à l'aide du programme COMNET par Segrest et coll.<sup>131</sup>.

Les résidus chargés positivement se retrouvent préférentiellement à proximité de l'interface polaire/apolaire tandis que les résidus chargés négativement sont retrouvés majoritairement au centre de la face polaire. Un total de 28 séquences hélicoïdales d'apolipoprotéines ont été analysées : A-I (44-65, 66-87, 99-120, 121-142, 143-164, 165-186, 187-208, 220-241), A-II (18-30, 39-47, 52-66), A-IV (40-61, 62-83, 95-116, 117-138, 139-160, 161-182, 183-204, 205-226, 227-248, 249-269, 270-288, 289-310, 311-332), C-I (7-14, 18-29, 33-53) et C-III (40-67).

La classe A est la classe la plus communément rencontrée au sein des apolipoprotéines échangeables (six hélices potentielles sur onze dans l'apoA-I). Segrest montre que la distribution des résidus chargés au sein de la face polaire des hélices n'est pas aléatoire. Pour les hélices de classe A, les résidus chargés positivement se situent plutôt à l'interface polaire/apolaire c'est à dire aux extrémités de la face polaire tandis que les résidus chargés négativement se retrouvent préférentiellement au centre de la face polaire (**figure 9**). La classe Y (quatre hélices potentielles sur onze dans l'apoA-I), présente une organisation différente : deux groupes de résidus chargés négativement séparent les deux bras et la base d'un "Y" formé par trois groupes de résidus chargés positivement. Enfin la classe G\*, peu représentée dans l'apoA-I (une hélice potentielle sur onze), se caractérise par une distribution aléatoire sur la face polaire des résidus chargés positivement et négativement. Cette sous-classe est donc très proche des hélices de classe G retrouvées dans les protéines globulaires (**tableau 6**) mais possède une face apolaire plus conséquente.

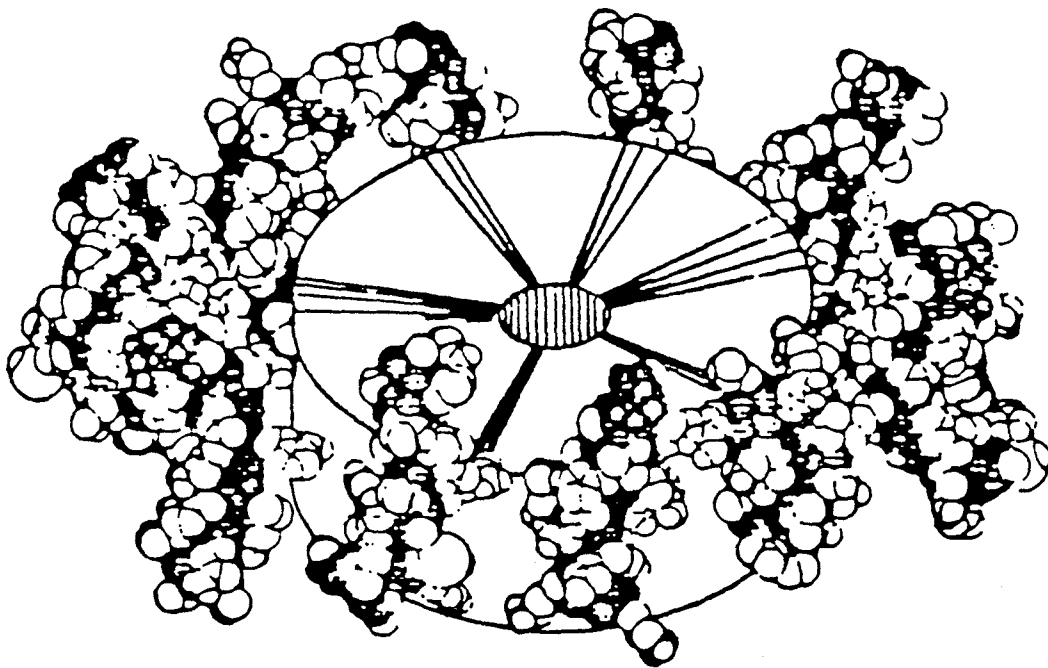
• Mis au point par R. Brasseur<sup>132</sup> de la faculté agronomique de Gembloux (Belgique), le programme Prot<sup>+</sup>/Tammo utilise une autre stratégie pour étudier les structures secondaire et tertiaire des molécules amphipathiques. Une première sélection des segments potentiellement amphipathiques et hélicoïdaux de la protéine est réalisée sur la base des méthodes prédictives de Eisenberg<sup>133</sup> et de Garnier et coll.<sup>118</sup>. La structure tri-dimensionnelle d'un segment sélectionné est ensuite construite à partir des valeurs standards associées à chacun des acides aminés de l'hélice  $\alpha$  (angles  $\Psi$  et  $\Phi$ , potentiels de torsion, longueurs de liaison inter-atomique, etc.). Les segments peptidiques hélicoïdaux sont ensuite orientés au sein d'une interface lipide-eau en tenant compte des énergies libres de transfert en tout point. Le potentiel moléculaire d'hydrophobicité (MHP) est alors déterminé en déplaçant une fenêtre de 0,2 nm le long de l'axe de l'hélice. Au cours de ce déplacement, on évalue la somme des énergies hydrophobes et hydrophiles des atomes faisant partie de la fenêtre. A l'issue de ce calcul, un traitement mathématique permet de représenter en 3 dimensions les contours hydrophobe et hydrophile de l'hélice. Par rapport au calcul du moment hydrophobe qui permet également de quantifier l'amphipathicité d'une structure hélicoïdale mais sous la forme d'un seul vecteur pour toute la molécule, le MHP présente l'avantage de fournir la carte des énergies hydrophobe et hydrophyle entourant l'hélice modélisée. Un exemple d'une telle représentation pour une hélice de l'apolipoprotéine A-I est présenté sur la **figure 15**.



**Figure 10. Représentation d'une unité de répétition hélicoïdale de l'apoA-I humaine d'après son analyse conformationnelle par le programme Prot<sup>+</sup>/Tammo de R. Brasseur.**

Les contours en pointillés indiquent les surfaces hydrophobes et en trait plein les surfaces hydrophiles.

Comme le programme de Segrest, l'analyse conformationnelle selon Brasseur permet de classer les hélices amphipathiques en plusieurs catégories spécifiques. Les résultats de Brasseur soulignent l'importance des angles formés par les faces polaires et apolaires pour la classification des hélices. Brasseur et coll. ont ensuite utilisé leur analyse afin de développer un modèle de lipoprotéine reconstituée<sup>134</sup>. L'utilisation de nombreuses méthodes d'études spectroscopiques telles que le dichroïsme circulaire ou la spectroscopie infrarouge a parallèlement permis de vérifier le modèle présenté dans la **figure 16**. Ce modèle correspond à la prédiction de la structure des complexes discoïdaux phospholipides/apoA-I comportant deux molécules d'apoA-I par disque. Il indique la présence d'une interaction entre les chaînes alkyles des phospholipides et 6 hélices de 17 acides aminés orientées de façon antiparallèle. Les hélices interagissant avec les lipides sont les hélices numérotées 5, 7, 8, 9 et 10 de la **figure 12** (résidus 102-239). Un aspect intéressant du modèle est que l'arrangement antiparallèle des hélices, rendu possible par la présence de coudes  $\beta$  entre elles, autorise la formation de ponts salins entre les différentes paires d'hélices. Ces interactions électrostatiques stabiliseraient ainsi la structure tertiaire de la protéine<sup>135</sup>. Les acides aminés impliqués dans ces interactions ioniques sont indiquées dans le **tableau 9**.



**Figure 16.** Modélisation par le programme Prot\*/Tammo d'un complexe discoïdal composé d'une bicouche de phospholipides et de 2 molécules d'apoA-I (12 hélices)<sup>134</sup>.

**Tableau 9. Interactions électrostatiques probables et distances inter-atomiques entre paires d'ions d'hélices adjacentes de l'apoA-I humaine modélisées par le programme Prot<sup>+</sup>/Tammo<sup>136</sup>.**

1 <sup>ère</sup> hélice $\alpha$	coude $\beta$	2 <sup>ème</sup> hélice $\alpha$	Paires d'ions	Distance (nm)
102-118	119-123	124-140	R116 $\leftrightarrow$ E125	0,63
124-140	141-145	146-162	E128 $\leftrightarrow$ R160	0,17
			R131 $\leftrightarrow$ D157	0,91
			E139 $\leftrightarrow$ R149	0,55
146-162	163-167	168-184	R149 $\leftrightarrow$ E183	0,79
			R153 $\leftrightarrow$ E179	0,76
			R153 $\leftrightarrow$ E183	0,86
			D157 $\leftrightarrow$ R173	0,79
			R160 $\leftrightarrow$ E168	0,20
168-184	185-189	190-206	R171 $\leftrightarrow$ E198	0,29
			R171 $\leftrightarrow$ E205	0,60
			K182 $\leftrightarrow$ E198	0,83

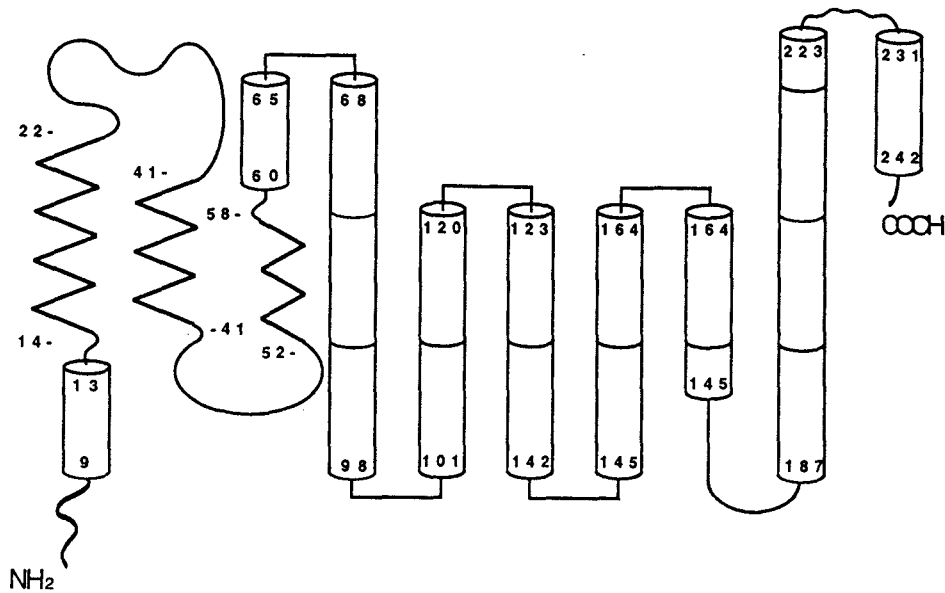
• L'analyse conformationnelle selon Nolte et Atkinson<sup>137</sup> n'a, pour le moment, été appliquée qu'à 2 molécules : l'apoA-I et l'apo E-3. Cette méthode de prédiction consiste en l'analyse d'un nombre exhaustif de paramètres physiques (probabilités conformationnelles, hydrophobicité, encombrement, etc.) pour chaque acide aminé de la séquence primaire. Ces données sont ensuite moyennées et représentées sur un simple graphique. Sur la base de cette méthode complétée par des données expérimentales (dichroïsme circulaire, reconstitution d'HDL), Nolte et Atkinson proposent un modèle structural de l'apolipoprotéine A-I associée aux lipides (**figure 17**). Ce modèle suggère également l'existence au sein de l'apolipoprotéine A-I, de 6 segments hélicoïdaux majeurs. Les données principales de ce modèle sont les suivantes :

- la région N-terminale [1-65] de l'apoA-I est la moins structurée et la partie (1-37) constituerait un domaine replié de façon autonome. Cette dernière prédiction est confirmée par des études montrant une susceptibilité plus importante de ce domaine à la protéolyse lorsque l'apoA-I est liée aux lipides<sup>138</sup>.




- la structure de la région centrale [99-186] de l'apoA-I ne diverge pas sensiblement de la prédiction de Brasseur et coll.<sup>134</sup>.

- Nolte et Atkinson proposent qu'il existe deux longues hélices de 35 résidus parmi les 6 segments amphipathiques, une du côté N-terminal (68-98) et l'autre du côté C-terminal (187-223).

- L'extrémité C-terminale (231-242), plus hydrophobe, permettrait un ancrage de l'apoA-I au coeur lipidique des HDL.



**Figure 17. Modélisation de la structure secondaire de l'apoA-I humaine selon Nolte et Atkinson<sup>137</sup>.**

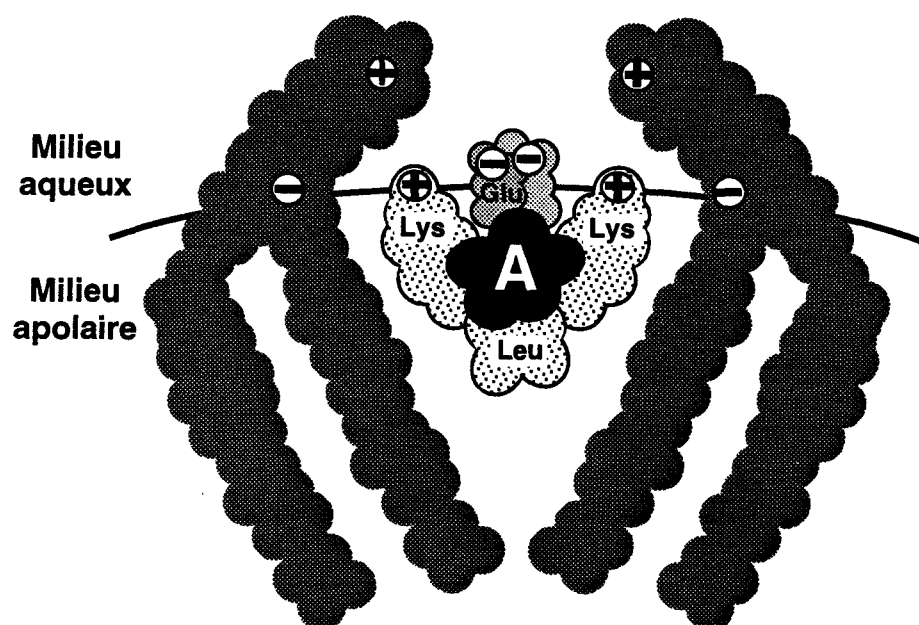
Les éléments de structure secondaire sont représentés de la façon suivante : hélices  $\alpha$  (  ), feuillets  $\beta$  (  ), coude  $\beta$  (  ), et les pelotes statistiques en courbes irrégulières.

### 1.2.5. L'outil peptidique

Des études utilisant des peptides synthétiques issus de séquences non naturelles ont permis de vérifier que l'hélice amphipathique constitue bien le motif structural responsable de l'association lipide/protéine dans les lipoprotéines échangeables. La synthèse de fragments isolés d'apolipoprotéines natives, ont permis, par ailleurs, la localisation de domaines intervenant dans la liaison avec les lipides et/ou dans l'activité biologique de la protéine. En 1975, Jackson et coll. montrent que parmi les 4 fragments peptiques obtenus par action du bromure de cyanogène sur l'apoA-I, seul le fragment 152-245 s'associe spontanément aux phospholipides<sup>139</sup>. Ils ont ainsi identifié ainsi pour la première fois, grâce à l'outil peptidique, le domaine d'association avec les lipides dans l'apolipoprotéine A-I humaine.

- Peptides synthétiques issus de séquences non-naturelles

La conception de peptides synthétiques "de novo" a permis d'apporter des éléments de réponse à des questions essentielles telles que l'importance de la distribution des charges au sein de la face polaire des hélices amphipathiques de classe A, ainsi que l'influence de la longueur des hélices et l'intérêt des résidus de proline.



**Figure 18.** Représentation schématique du modèle *snorkel* d'association des hélices amphipathiques de classe A aux lipides proposé par Kanellis et coll.<sup>140</sup>. L'axe de l'hélice amphipathique (A) est perpendiculaire au plan de la feuille. On note l'enfouissement important de l'hélice dans la partie apolaire grâce aux chaînes aliphatiques des résidus basiques (ici des lysines) et l'extension des parties chargées vers le milieu aqueux un peu à la manière du tuba (*snorkel* en anglais) d'un plongeur sous-marin.

La stabilisation des hélices adjacentes par l'établissement de liaisons électrostatiques est une des hypothèses proposées pour expliquer la distribution particulière des charges au sein de la face polaire des hélices amphipathiques de classe A<sup>134.135.136</sup>. Brasseur et coll.<sup>141.142</sup> suggèrent que l'établissement de tels ponts salins entre les hélices antiparallèles contribue de façon substantielle à la stabilité de l'apolipoprotéine quand celle-ci est liée aux lipides. Toutefois, d'autres études montrent que si de telles interactions sont nécessaires, elles ne sont pas suffisantes pour assurer la cohésion de l'association protéine/lipides. L'étude d'un peptide synthétique analogue d'une hélice de classe A (peptide 18A) a permis à Kanellis et coll.<sup>140</sup> de proposer une autre hypothèse pour expliquer la disposition non aléatoire des charges sur les hélices de classe A : le modèle *snorkel* (**figure 18**). Ces auteurs s'appuient sur le fait que la majorité des surfaces de Van der Waals des acides aminés chargés positivement (résidus basiques) est hydrophobe. Ils proposent donc que, lorsque une hélice de classe A est associée aux lipides, l'essentiel des surfaces de Van der Waals apolaires des résidus basiques situés à l'interface serait en contact avec la partie hydrophobe des phospholipides et étendrait leur partie

chargée vers le milieu aqueux (un peu à la manière du tuba, *snorkel* en anglais, d'un plongeur sous-marin). Ainsi, à la différence des autres classes d'hélices amphipathiques, cet arrangement particulier des charges permettrait une insertion plus profonde de l'hélice dans la couche lipidique et, par conséquent, une meilleure association lipides/protéine.

Razek et coll.<sup>143</sup> ont cependant montré récemment que le modèle *snorkel* ne constitue pas une caractéristique générale des hélices amphipathiques de classe A. En effet, bien que leur étude confirme que ce sont les interactions de type hydrophobe qui contribuent le plus à la stabilisation de ses hélices, ils montrent en utilisant la résonance magnétique nucléaire que les hélices [7-24] et [35-53] de l'apo C1 ne souscrivent qu'imparfaitement à l'hypothèse de l'effet *snorkel*. En outre, lorsqu'il s'applique, l'effet *snorkel* ne semble pas suffisant pour assurer une affinité importante des hélices amphipathiques pour les lipides. En effet, l'étude d'un peptide synthétique dérivé d'une séquence naturelle de l'apo E (203-266), prédite comme correspondant à une longue hélice amphipathique de classe A, a montré que ce segment s'associait très mal aux phospholipides<sup>144,145</sup>.

La proline constitue souvent le premier acide aminé des unités de répétitions dans les apolipoprotéines échangeables (**figure 10**). Les résidus de proline jouent un rôle important dans la coopérativité existante entre les paires d'hélices amphipathiques adjacentes. Ainsi, le dimère 18A-pro-18A de Segrest (37A) a été comparé au dimère 18A-18A (36A) quant à sa capacité à se lier aux phospholipides. Cette étude montre une capacité supérieure du 37A à entrer en compétition avec l'apoA-I au sein des HDL par rapport au 36A. Ce dernier peptide, consistant probablement en une simple et longue hélice amphipathique, présente même une affinité pour les phospholipides plus faible que le monomère 18A<sup>146</sup>. Ces diverses observations suggèrent donc que les résidus de proline qui ponctuent ces unités de répétitions dans les apolipoprotéines échangeables sont à l'origine d'une structuration particulièrement favorable pour l'association aux lipides des hélices amphipathiques de classe A.

- Peptides synthétiques issus de séquence natives

Les propriétés d'association avec les lipides diffèrent beaucoup d'une apolipoprotéine à l'autre. L'apoA-II, par exemple, entre en compétition et déplace l'apoA-I *in vitro* au sein des HDL<sup>67</sup>. Ceci montre bien que l'apoA-II possède une affinité supérieure à l'apoA-I vis-à-vis des lipides. De même, au sein d'une apolipoprotéine, il peut exister des différences notables entre les hélices amphipathiques au niveau de leur capacité d'association aux lipides. Ainsi, Palgunachari et coll.<sup>147</sup> ont récemment montré que parmi les différentes hélices de l'apoA-I, deux seulement (44-65 et 220-241) possèdent une affinité vis-à-vis des lipides suffisante pour clarifier des vésicules unilamellaires de DMPC. Compte tenu de la capacité d'association aux

lipides de l'apoA-I native, cette étude confirme l'existence d'un effet coopératif s'exerçant entre les hélices au cours de cette association. Une étude de Fukushima et coll.<sup>124</sup> montre d'ailleurs que le peptide [121-164] de l'apoA-I, correspondant à deux hélices théoriques successives, est capable de s'associer aux phospholipides et que le mécanisme d'association de ce peptide est comparable à celui de l'apoA-I native.

### **1.3. Structure quaternaire de l'apoA-I non associée aux lipides**

Bien que les principales fonctions connues de l'apolipoprotéine A-I s'expriment lorsque la protéine est associée aux lipides au sein des HDL, des quantités significatives d'apoA-I sont biosynthétisées par les cellules du foie et sécrétées à l'état libre dans le plasma<sup>148</sup>. De plus, durant la réaction de transfert de cholestérol estérifié par la CETP vers les LDL, des quantités non négligeables d'apoA-I libre seraient produites<sup>149</sup>. L'apoA-I libre est parfaitement soluble dans l'eau et s'agrège en dimères et oligomères<sup>150</sup> à des concentrations supérieures à 0,05 mg/ml. A l'état monomérique, l'apoA-I libre possède un pourcentage d' $\alpha$ -hélicité proche de 50% et semble très asymétrique si l'on en juge par des études hydrodynamiques<sup>151</sup>. Des interactions intra-moléculaires au niveau des hélices de l'apoA-I monomérique sont également envisageables. En effet, de telles interactions ont été mises en évidence dans l'apo E<sup>116</sup>. Sous forme oligomérique, la conformation la plus probable serait un dimère résultant de l'agrégation de 2 molécules d'apoA-I par certaines de leurs régions hydrophobes<sup>150</sup>. Les formes plus complexes proviendraient de l'agrégation de plusieurs de ces dimères toujours par des interactions de type hydrophobe.

## **2. STRUCTURE DE L'APOLIPOPROTEINE A-I ASSOCIEE AUX HDL**

Il existe donc pour l'apoA-I deux états conformationnels majeurs : un état correspondant à la molécule libre et un état correspondant à la molécule engagée dans une liaison non covalente avec des lipides au sein des HDL. Ces dernières années, l'attention de nombreux chercheurs s'est portée sur la conformation de l'apoA-I associée aux lipides et en particulier sur la capacité de cette molécule à former, en présence de phospholipides et dans certaines conditions expérimentales bien précises, des particules ressemblant aux HDL plasmatiques : les HDL reconstituées. Ces études ont surtout porté sur des reconstitutions de HDL discoïdales plutôt que sur des particules sphériques, en raison des difficultés rencontrées pour obtenir des complexes sphériques homogènes. Les particules reconstituées constituent un modèle intéressant pour l'étude de la conformation des apolipoprotéines au sein des HDL natives.



## 2.1. les méthodes de reconstitutions de HDL

Trois méthodes de reconstitution d'HDL sont généralement utilisées :

- La co-sonication d'un mélange lipides/protéine.
- L'interaction spontanée des vésicules lipidiques avec les apolipoprotéines.
- La reconstitution à l'aide d'un détergent.

La méthode par co-sonication est la moins employée car elle pose des problèmes de reproductibilité et donne des rendements peu importants. Les deux autres méthodes, en revanche, sont fiables et permettent l'obtention, à partir d'apoA-I et de phospholipides synthétiques, de particules reconstituées dont les dimensions et la composition sont proches de celles des HDL naissantes. Cependant, la méthode par interaction spontanée est cinétiquement contrôlée par l'état physique du lipide (équilibre entre état liquide-cristallin et état gel-cristallin du lipide) et, en conséquence, par la composition des vésicules lipidiques utilisées. Cette méthode reste donc limitée à quelques phospholipides (DLPC, DMPC,...) possédant des chaînes courtes et pour lesquels la stabilisation des vésicules par interactions hydrophobes est limitée. La reconstitution avec un détergent, en revanche, fait intervenir une étape de dispersion des lipides par le cholate de sodium, permettant l'utilisation d'une palette beaucoup plus large de phospholipides.

Quelle que soit la méthode utilisée, la production de complexes discoïdaux est obtenue lorsque la fraction molaire de l'apoA-I par rapport aux lipides dépasse 0,025<sup>23</sup>. A des valeurs inférieures, on constate la production simultanée de complexes vésiculaires lipides/apoA-I non discoïdaux. L'importance de cette contamination et la taille des disques obtenus dépendent également du phospholipide utilisé et de la taille des vésicules de départ. Les cinétiques de formation des complexes phospholipides/protéine sont également fonction de ces mêmes paramètres<sup>23</sup>. En revanche, l'état d'agrégation de l'apoA-I lors de l'incubation ne semble pas influencer de façon importante sur la capacité de reconstitution d'HDL par cette apolipoprotéine.

Bien que la taille des complexes discoïdaux soit fonction du rapport lipide/protéine initial, un mélange donné peut conduire à la production d'un mélange homogène ou hétérogène de

particules<sup>125,152</sup>. La formation de particules de tailles différentes fût dans un premier temps expliquée par des variations dans le nombre de molécules d'apoA-I associées aux lipides dans les particules reconstituées<sup>153</sup>. Une particule discoïdale peut en effet contenir de 2 à 4 molécules d'apoA-I. Une méthode d'élimination du cholate sur billes de polystyrène divinylbenzène<sup>154</sup> (Biobeads, SM<sub>2</sub>) permet, lors de la préparation de complexes discoïdaux avec ce détergent, d'obtenir des particules stoechiométriquement homogènes. Cependant, une analyse plus précise a permis à l'équipe de Jonas<sup>125,155</sup> de mettre à jour une hétérogénéité supplémentaire ne pouvant être expliquée par une variation du nombre d'apoA-I par particule. Swaney<sup>153</sup> suggère que cette variation provient d'une différence de conformation de l'apolipoprotéine au sein des HDL reconstituées. Cette hypothèse est confirmée par l'utilisation d'une autre technique de caractérisation des particules reconstituées : l'électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition non dénaturante. Les caractéristiques physico-chimiques de HDL reconstituées discoïdales sont présentées dans le **tableau 10**. Les différences existantes entre les préparations proviennent des conditions opératoires d'obtention des HDL reconstituées, les conditions de caractérisation utilisées étant homogènes dans ce tableau.

**Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques de HDL discoïdales reconstituées avec l'apoA-I humaine.**

C : cholestérol, POPC : 1-Palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3 phosphatidylcholine. Lp2A-I, Lp3A-I, Lp4A-I : HDL contenant respectivement 2, 3 et 4 apoA-I par particules.

Les diamètres sont déterminés par électrophorèse sur gel en conditions non dénaturantes. Les rapports POPC/apoA-I et POPC/C/apoA-I sont des rapports molaires.

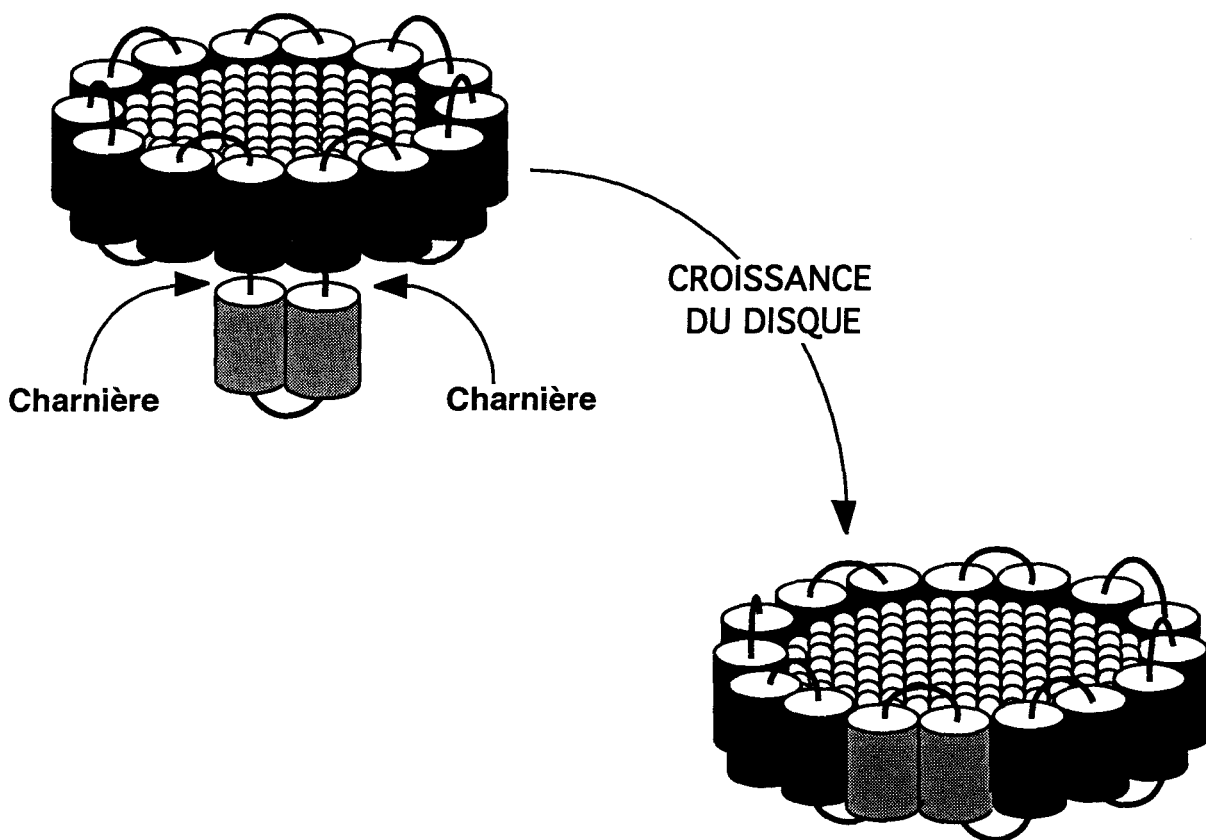
	Sparks et coll. <sup>121</sup>		Dalton and Swaney <sup>156</sup>	
	méthode au cholate - Biobeads		méthode au cholate - Biobeads	
	POPC/apoA-I	Diamètre (nm)	POPC/apoA-I	Diamètre (nm)
Lp2A-I reconstituées	32:1	9,4	41:1	8,3
	65:1	9,8	62:1	10,1
	80:1	10,2	72:1	10,6
	128:1	10,6	100:1	11,0

	Sparks et coll. <sup>157</sup>		Jonas et coll. <sup>158</sup>	
	méthode au cholate - dialyse		méthode au cholate - dialyse	
	POPC/C/apoA-I	Diamètre (nm)	POPC/C/apoA-I	Diamètre (nm)
Lp2A-I reconstituées	39-47:6:1	7,8	25-42:1-6:1	7,6
	104-110:3:1	9,6	85:3:1	11,8
Lp3A-I reconstituées	85:17:1	10,8	82:19:1	10,9
	126-142:6:1	13,4		
Lp4A-I reconstituées	171:14:1	17,0		

Alors que la production de complexes discoïdaux est maintenant techniquement bien maîtrisée, l'obtention de particules sphériques homogènes semble plus difficile à mettre en oeuvre. Jonas et coll.<sup>126</sup> ont cependant obtenu des particules sphériques homogènes en incubant des HDL reconstituées discoïdales avec de la LCAT et des LDL. En s'inspirant de ce travail, Rye et coll.<sup>159</sup> ont préparé des complexes sphériques contenant de l'apoA-I et de l'apoA-II en utilisant la capacité de déplacement de l'apoA-I par l'apoA-II. Néanmoins, les données concernant la structure des HDL reconstituées sphériques restent encore peu abondantes.

## 2.2. Etudes structurales des HDL reconstituées



**Figure 19. Représentation schématique de l'hypothèse de la "région charnière" de l'apoA-I, proposée par l'équipe de Segrest<sup>89</sup>.**  
Une paire d'hélices (représentées par des cylindres) pivote par l'intermédiaire de 2 coudes  $\beta$  faisant office de "charnières", et vient se positionner sur la surface hydrophobe en croissance du disque.

En 1984, l'équipe de Segrest<sup>89</sup> a proposé une hypothèse pour expliquer les variations de taille de complexes discoïdaux équivalents du point de vue du nombre d'apoA-I par particule. Cette hypothèse, dite de la "région charnière", est échafaudée sur la base de l'interprétation d'un gel non dénaturant de complexes DMPC/apoA-I discoïdaux. Ce gel montre une bonne reproductibilité dans les variations de diamètre de Stokes entre les différentes populations stoechiométriquement équivalentes pour les complexes comprenant 2 et 3 molécules d'apoA-I par particule. Cette différence, évaluée à 1,3 nm, correspond à une variation de circonférence du disque de 4,08 nm. Jonas et coll.<sup>126</sup> ont évalué cette même variation à 1,0 nm (3,14 nm de circonférence) dans des particules discoïdales reconstituées avec du POPC et du cholestérol. Or ces variations sont compatibles avec l'addition ou la suppression d'une ou plusieurs hélices sur les bords du disque. Un mécanisme de croissance des HDL discoïdales naissantes par l'intermédiaire d'une région particulière, baptisée "région charnière" a donc été proposé<sup>160</sup>. Ce mécanisme, schématisé sur la **figure 19**, mettrait en jeu une paire d'hélices, associée aux lipides (disque de grande taille) ou non (disque de petite taille) en fonction de la circonférence des particules. De nombreuses études structurales sont venues corroborer cette hypothèse. En particulier, la résolution de la structure RX d'une apolipoprotéine d'insecte (LpIII)<sup>161</sup> montre que celle-ci peut adopter deux conformations distinctes : une forme totalement structurée et une autre moins structurée comportant une paire d'hélices désolidarisées du reste de la molécule.

### 2.2.1. Etudes spectroscopiques

La spectroscopie infrarouge à réflexion atténuée (ATR IR) apporte des informations sur l'orientation des hélices des apolipoprotéines dans les particules discoïdales. Par cette technique, Brasseur et coll.<sup>142</sup> ont montré que les hélices amphipathiques de l'apoA-I se positionnent parallèlement aux chaînes alkyles des phospholipides dans les HDL naissantes. Par ailleurs, Wald et coll.<sup>162</sup> ont réalisé une étude spectroscopique sur trois complexes discoïdaux de tailles homogènes en utilisant l'ATR IR et la polarisation de fluorescence. Les résultats confirment que les hélices sont essentiellement orientées parallèlement aux chaînes alkyles des phospholipides et indiquent que la structure secondaire de l'apoA-I est identique dans les trois populations de particules.

La technique la plus informative en matière d'étude structurale est sans doute la résonance magnétique nucléaire (RMN). Pourtant, son utilisation reste limitée dans le cas de complexes macromoléculaires tels que les HDL reconstituées. Grâce à un marquage spécifique des résidus de lysine au <sup>13</sup>C, Phillips et coll.<sup>121</sup> ont étudié par RMN les conformations de l'apoA-I associée aux lipides au sein de complexes discoïdaux comprenant 2 molécules d'apoA-I par particule. Ils montrent ainsi que la conformation de l'apoA-I est différente au sein des HDL reconstituées

stoechiométriquement équivalentes mais de tailles différentes. Ces auteurs ont également proposé un modèle structural de l'apoA-I liée aux lipides au sein des HDL (figure 20). Selon ces auteurs, les différences de structuration de l'apoA-I dans les complexes discoïdaux s'exerceraient au niveau du premier tiers N-terminal de la protéine et non pas au niveau d'une région charnière centrale.

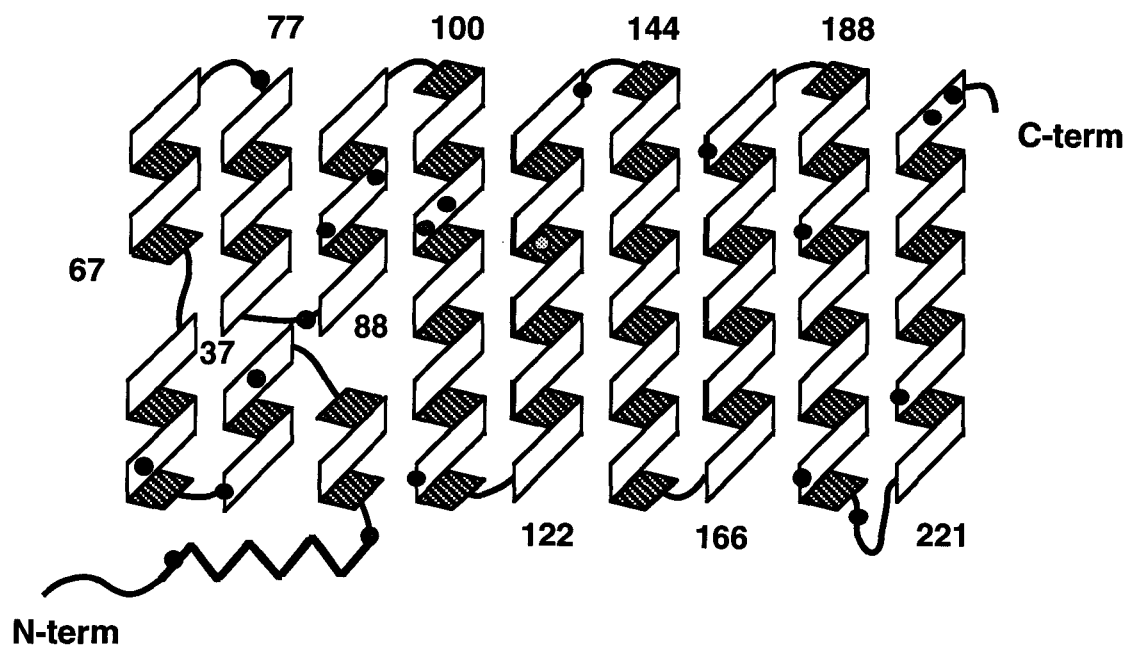


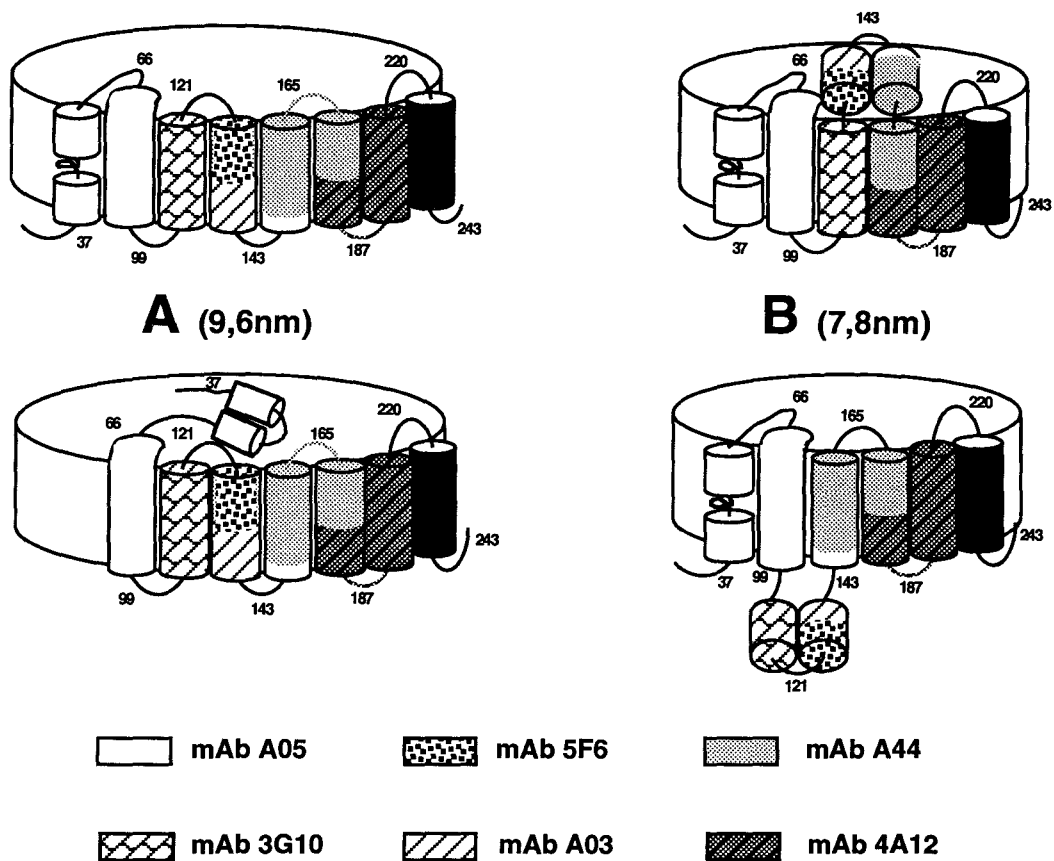
Figure 20. Modèle structural de l'apoA-I humaine liée aux lipides selon Sparks et Coll.<sup>157</sup>.

Le motif en ruban représente la structure  $\alpha$ -hélicoïdale amphipathique ponctuée par des coudes  $\beta$  ( $\wedge$ ), de la pelote statistique ( $\mathcal{N}$ ), et du feuillet  $\beta$  ( $\mathcal{M}$ ). Les faces polaires des hélices sont indiquées en blanc et les faces apolaires en foncé. La localisation des résidus de lysine est indiquée par un cercle (● ou ⊙). Les nombres indiquent les positions des résidus le long de la séquence de l'apoA-I.

### 2.2.2. Etudes immuno-chimiques

Des anticorps monoclonaux (mAbs) ont également été utilisés de manière intensive dans le but de préciser la conformation de l'apoA-I au sein des HDL natives ou reconstituées, ainsi que les facteurs capables de moduler l'expression des épitopes correspondants. Certains mAbs produits à partir de HDL reconnaissent de façon plus importante l'apoA-I libre que les lipoprotéines<sup>163</sup>. Toutefois, l'état associé aux lipides a permis d'augmenter l'immuno-réactivité de l'apoA-I pour 3 épitopes superposés, situés dans une région comprise entre les résidus 95 et 120<sup>163,164</sup>. Ce domaine apparaît donc bien comme une région exposée au sein des HDL. La

partie N-terminale extrême de l'apolipoprotéine, correspondant aux résidus 2-8 et 1-15, semble également très exposée<sup>24,163</sup>.



**Figure 21. Structure de l'apoA-I dans les HDL discoïdales, prédite par des études immuno-chimiques<sup>165</sup>.**

Les hélices  $\alpha$  amphipathiques (représentées par des cylindres) sont orientées parallèlement à l'axe du disque et de façon antiparallèle les unes par rapport aux autres. Chaque motif correspond à un épitope différent dont l'anticorps associé est indiqué dans la légende.

A (dessus) : ApoA-I liée aux lipides par 8 hélices dans les HDL discoïdales comprenant deux molécules d'apoA-I par particule (9,6 nm). A (dessous) : Structure intermédiaire de l'apoA-I liée aux lipides par 7 hélices dans les HDL discoïdales comprenant deux molécules d'apoA-I par particule (9,6 nm).

B : 2 structures intermédiaires de l'apoA-I liée aux lipides par 6 hélices dans les HDL discoïdales comprenant deux molécules d'apoA-I par particule (7,8 nm).

La production de HDL reconstituées de taille homogène a offert des perspectives intéressantes pour l'étude de la conformation de l'apoA-I liée aux lipides. Marcel et coll. ont

étudié l'effet de la taille des HDL reconstituées sur la conformation de l'apoA-I humaine en utilisant l'outil immuno-chimique<sup>165</sup>. Une collection très précisément cartographiée de 15 anticorps monoclonaux<sup>24</sup> a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- L'association de l'apoA-I aux lipides implique un changement de conformation de la molécule qui affecte la plupart des domaines de la protéine.

- La conformation de l'apoA-I est sensiblement différente dans les diverses sous-classes de particules stoechiométriquement homogènes.

- L'arrangement discontinu de certains épitopes est en accord avec l'hypothèse d'un arrangement antiparallèle des hélices amphipathiques dans la région centrale de la protéine.

- Des expériences de compétition, utilisant des mAbs pris deux par deux, suggèrent que la région centrale de l'apoA-I, comprise entre les résidus 99 et 164, constitue la région de conformation la plus variable lors de la croissance des HDL reconstituées discoïdales. Les auteurs proposent que ce segment de la protéine constitue la "région charnière" proposée par Segrest<sup>89</sup>.

Sur la base de ces études immuno-chimiques, les auteurs proposent par ailleurs un modèle moléculaire de la conformation de l'apoA-I humaine dans les particules discoïdales<sup>165</sup> (**figure 21**). Par une approche similaire, Luchoomun et coll.<sup>20</sup> suggèrent que le domaine N-terminal de l'apolipoprotéine se positionnerait sur la face polaire du disque de telle sorte que la région 25-82 de l'apoA-I soit proche dans l'espace de la région centrale (149-186) de l'apolipoprotéine.

### 2.2.3. Protéolyse limitée

La protéolyse limitée constitue un outil précieux pour préciser la conformation d'une protéine. Cette technique a été utilisée par quelques groupes de recherche s'intéressant à la conformation de l'apoA-I liée aux lipides. En particulier, l'équipe de Swaney a fait subir plusieurs protéolyses limitées (trypsine, protéase de *S. aureus* V8, et elastase) à des HDL reconstituées discoïdales. L'analyse des fragments obtenus<sup>156</sup> a permis de mettre en évidence un domaine N-terminal (résidus 1 à 91) très résistant aux protéases. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues par Kunitake et coll.<sup>166</sup> dont les clivages enzymatiques de HDL pré- $\beta$  produisent également un fragment résistant de 12 à 14 kDa correspondant à cette même extrémité. De nombreuses études suggérant que ce domaine n'est pas impliqué dans

l'association lipides/protéine<sup>120.134</sup>, les auteurs considèrent que la résistance aux enzymes de ce fragment provient d'une organisation pseudo-globulaire de la partie N-terminale de la protéine. En revanche, la partie carboxy-terminale de ce fragment (résidu 91) semble très sensible à l'action limitée des enzymes protéolytiques. Les résultats de Dalton et Swaney, à l'instar de ceux de Kunitake et coll., sont donc en accord avec l'hypothèse d'une région accessible au niveau de l'hélice 5 (résidus 99-120).

Dans une étude similaire, Lins et coll.<sup>138</sup> ont soumis des HDL reconstituées discoïdales à une digestion enzymatique par la protéinase K, la trypsine et la pronase. Un fragment C-terminal de 24 kDa correspondant au produit d'un clivage au niveau des résidus 43-46 est retrouvé. Un fragment similaire<sup>115</sup> est obtenu avec des HDL discoïdales reconstituées, purifiées, contenant du POPC et soumises à l'action de la chymotrypsine et de la protéase de *S. aureus* V8. Par ailleurs, cette étude montre la sensibilité très marquée des unités de répétition hélicoïdales 5 et 6, tandis que les autres unités de répétition hélicoïdales semblent, au contraire, très résistantes. Cette dernière observation est, une fois de plus, en accord avec la présence dans la partie centrale de l'apolipoprotéine, d'une région mobile, capable de modifier la conformation de l'apoA-I au sein des HDL. La grande résistance de l'extrémité C-terminale (résidus 165-243) confirme, par ailleurs, l'importance de cette région dans la liaison de la protéine avec les lipides.

## 2.3. Variants naturels et mutagénèse dirigée

### 2.3.1. Variants naturels

Sur la base d'une séparation électrophorétique de 32000 échantillons sanguins, 20 variants naturels de l'apoA-I humaine<sup>167 à 176</sup> ont pu être mis en évidence et caractérisés. La combinaison de méthodes telles que l'HPLC, la spectrométrie de masse et le séquençage protéique, a permis d'identifier ces variants présentés dans le **tableau 11**. L'analyse de ces différentes mutations montre que la plupart ne sont pas distribuées de façon statistique dans la séquence de la protéine. En réalité, trois critères régissent cette distribution :

- Une hypervariabilité des cytosines sur l'extrémité 5' du gène, donnant lieu à 3 mutations affectant les proline 3 et 4.
- Une hypervariabilité des dinucléotides CpG principalement rencontrée dans les triplets codant pour les domaines  $\alpha$  hélicoïdaux (résidus 103, 136, 169, 177 et 198)
- des mutations rencontrées dans les segments hélicoïdaux entraînant peu de conséquences conformationnelles (segment 103-198).



**Tableau 11. Les principaux variants naturels de l'apolipoprotéine A-I : substitution, codon affecté et références bibliographiques.**

Substitution	Codon	Variation	Référence
Pro <sup>3</sup> ⇒ Arg	<u>CCC</u>	C ⇒ G	Von Eckardstein et coll. (1989) <sup>167</sup>
Pro <sup>4</sup> ⇒ His	<u>CCC</u>	C ⇒ A	Menzel et coll. (1984) <sup>168</sup>
Pro <sup>4</sup> ⇒ Arg	<u>CCC</u>	C ⇒ G	Menzel et coll. (1984) <sup>168</sup>
Arg <sup>10</sup> ⇒ Leu <sub>Baltimore</sub>	<u>CGA</u>	G ⇒ T	Von Eckardstein et coll. (1990) <sup>169</sup>
Gly <sup>26</sup> ⇒ Arg <sub>Iowa</sub>	<u>CGGC</u>	G ⇒ C	Nichols et coll. (1988) <sup>170</sup>
Asp <sup>89</sup> ⇒ Glu	<u>GATC</u>	T ⇒ G, A	Von Eckardstein et coll. (1990) <sup>181</sup>
Asp <sup>103</sup> ⇒ Asn	<u>CGAC</u>	G ⇒ A	Menzel et coll. (1984) <sup>168</sup>
Lys <sup>107</sup> ⇒ Ø			Rall et coll. (1984) <sup>171</sup>
Lys <sup>107</sup> ⇒ Met	<u>AAG</u>	A ⇒ T	Von Eckardstein et coll. (1990) <sup>169</sup>
Glu <sup>136</sup> ⇒ Lys	<u>CGAG</u>	G ⇒ A	Mahley et coll. (1984) <sup>172</sup>
Glu <sup>139</sup> ⇒ Gly	<u>GAG</u>	A ⇒ G	Von Eckardstein et coll. (1990) <sup>169</sup>
Pro <sup>143</sup> ⇒ Arg	<u>CCA</u>	C ⇒ G	Utermann et coll. (1984) <sup>173</sup>
Glu <sup>147</sup> ⇒ Val	<u>GAG</u>	A ⇒ T	Von Eckardstein et coll. (1990) <sup>181</sup>
Ala <sup>158</sup> ⇒ Glu	<u>GCG</u>	C ⇒ G	Mahley et coll. (1984) <sup>184</sup>
Pro <sup>165</sup> ⇒ Arg	<u>CCC</u>	C ⇒ G	Von Eckardstein et coll. (1989) <sup>167</sup>
Glu <sup>169</sup> ⇒ Gln	<u>CGAG</u>	G ⇒ C	Von Eckardstein et coll. (1990) <sup>169</sup>
Arg <sup>173</sup> ⇒ Cys <sub>Milano</sub>	<u>GCGC</u>	C ⇒ T	Weisgraber et coll. (1983) <sup>174</sup>
Arg <sup>177</sup> ⇒ His <sub>Münster</sub>	<u>CGC</u>	G ⇒ A	Jabs et coll. (1986) <sup>175</sup>
Glu <sup>198</sup> ⇒ Lys <sub>Yame</sub>	<u>CGAG</u>	G ⇒ A	Takada et coll. (1989) <sup>176</sup>
Asp <sup>213</sup> ⇒ Gly <sub>Fukuoka</sub>	<u>GAC</u>	A ⇒ G	Takada et coll. (1989) <sup>176</sup>

L'importance de la ponctuation des hélices amphipathiques de l'apoA-I par les résidus de proline a déjà été soulignée dans un précédent chapitre. Quelques mutations naturelles affectant ces résidus ont été identifiées (**tableau 11**). Celles qui concernent les résidus de proline situés dans la partie N-terminale extrême de la protéine (résidus 3 et 4) n'entraînent pas de conséquences structurales pour l'apoA-I au sein des HDL reconstituées. Ce résultat était prévisible puisque ce domaine de l'apoA-I ne semble pas intervenir de façon importante au niveau de la liaison de l'apoA-I avec les lipides. Le variant Pro<sup>143</sup>⇒ Arg a également été décrit comme n'impliquant aucune modification structurale importante des HDL reconstituées<sup>177</sup>. En revanche, les individus hétérozygotes pour la mutation Pro<sup>165</sup>⇒ Arg possèdent des concentrations d'HDL plasmatiques significativement plus basses que les individus normaux<sup>167</sup>. Parmi d'autres explications possibles, cette anomalie pourrait être significative d'un défaut structural de la protéine. Toutefois, l'introduction de ce variant dans des HDL

reconstituées montrent que ces particules sont également physico-chimiquement proches de celles reconstituées avec l'apoA-I native<sup>19</sup>. Ces observations sont importantes car cette mutation s'accompagne, par ailleurs, d'un effet fonctionnel significatif puisque l'efflux de cholestérol induit par les HDL reconstituées avec ce variant est inférieur de 30% à celui obtenu avec l'apoA-I native<sup>177</sup>.

### 2.3.2. Mutagenèse dirigée

Minnich et coll.<sup>178</sup> ont obtenu, par mutagenèse dirigée, les mutants d'apoA-I Pro<sup>99</sup>⇒ His et Pro<sup>121</sup>⇒ His. Le mutant Pro<sup>121</sup>⇒ His présente une capacité inférieure à celle de l'apoA-I native pour s'associer aux lipides tandis que le mutant Pro<sup>99</sup>⇒ His se comporte de façon l'apoA-I. Cependant les faibles quantités produites n'ont pas permis la préparation de HDL reconstituées avec ces mutants.

En revanche, d'autres mutants d'apoA-I ont pu être produits en plus grande quantité par mutagenèse dirigée<sup>179,180</sup>. L'un d'eux, particulièrement intéressant, comporte une délétion de l'extrémité N-terminale (Δ1-43). Les études d'association avec des phospholipides réalisées avec ce variant confirment que le domaine N-terminal extrême de l'apoA-I ne joue pas un rôle majeur dans la stabilisation de l'association lipides/apoA-I. Minnich et coll.<sup>178</sup> ont obtenu des mutants d'apoA-I possédant des segments délétés à l'extrémité C-terminale : Δ 148-186, Δ 212-233 et Δ 212-243. Ils ont montré que ces délétions entraînent une diminution de l'affinité de l'apoA-I pour les lipides. Cette étude, confirmée par Holvoet et coll.<sup>122</sup>, démontre l'importance du domaine C-terminal pour la fixation de l'apoA-I aux lipides au sein des HDL.

## 2.4. Conclusion

Les études de modélisation moléculaire, complétées par les approches spectroscopiques et immuno-chimiques sur des HDL reconstituées, permettent d'avoir une idée plus précise de la structure de l'apoA-I en solution et au sein des HDL. Bien qu'il soit raisonnable de proposer, sur la base des connaissances actuelles, que différents états conformationnels définis de l'apoA-I existent lorsque cette protéine est associée aux lipides, il paraît peu probable que ces variations puissent être entièrement expliquées par l'hypothèse de la "région charnière"<sup>115</sup>. En particulier, les différences de taille observées entre des HDL discoïdales stoechiométriquement homogènes trouvent sans doute leur fondement dans un mécanisme plus fin que la simple exclusion d'une double hélice. Toutefois, les études décrites dans les paragraphes précédents suggèrent la présence, dans la région centrale de l'apoA-I (résidus 99 à 183), d'un domaine

structural flexible et accessible. En revanche, le domaine C-terminal de l'apoA-I présente une conformation stable et homogène lorsque cette apolipoprotéine est associée aux lipides, ce domaine servant vraisemblablement d'ancrage dans la couche lipidique. Enfin, la partie N-terminale semble moins investie dans la liaison de l'apolipoprotéine aux lipides et apparaît structurée de façon relativement autonome.

Il faut cependant souligner le caractère simplifié des HDL reconstituées par rapport aux HDL présentes *in vivo*. L'influence possible d'autres apolipoprotéines comme l'apoA-II ou les apo C sur la structure de l'apoA-I au sein des HDL natives n'est donc pas prise en compte dans le modèle synthétique. Les HDL reconstituées restent néanmoins un excellent modèle d'étude pour déterminer les conformations de l'apoA-I au sein des HDL et constituent également des outils efficaces pour l'étude du rôle métabolique de l'apoA-I dans la protection vis à vis de l'athérosclérose.

### 3. FONCTIONS DE L'APOA-I

#### 3.1. Activation de la LCAT

##### 3.1.1. L'Enzyme

La lécithine cholestérol acyl transférase humaine (LCAT, EC 2.3.1.43) est une glycoprotéine (60 kDa) composée d'une simple chaîne polypeptidique (416 acides aminés) et de glycanes représentant 25% du poids de la molécule<sup>181</sup>. Bien que sa séquence en acides aminés soit connue<sup>182</sup>, la structure de la LCAT est encore peu documentée. Le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité de l'enzyme<sup>183</sup> (21%) et son caractère asymétrique<sup>184</sup> constituent, pour le moment, les seules données structurales connues.

La LCAT est une serine-hydrolase qui agit au niveau des HDL en transférant le groupe acyl en 2- des lécithines ou des phosphatidyl-éthanolamines vers la fonction alcool libre des stérols, en particulier du cholestérol, afin de générer des esters de stérols (retenus dans les HDL) et de la lysolécithine (**figure 4**). Elle intervient par son activité catalytique au niveau de fonctions importantes dans le métabolisme des lipoprotéines :

- elle participe à la conversion des HDL discoïdales en HDL sphériques par création d'un noyau apolaire de cholestérol estérifié insoluble dans la bicouche composée de phospholipides et de cholestérol non estérifié.

- elle maintient l'équilibre entre le cholestérol libre et le cholestérol estérifié

- elle crée le gradient nécessaire au transfert du cholestérol libre des tissus vers le plasma dans la phase initiale du transport inverse du cholestérol.
- elle intervient dans la voie métabolique des phospholipides par la conversion des lécithines en lysolécithines.

En l'absence totale de cholestérol, la LCAT est une phospholipase, qui génère de la lysolécithine et des acides gras libres. La LCAT catalyse également des échanges d'acides gras entre lécithine et lysolécithine, avec pour conséquence une redistribution des positions 1- et 2- des acides gras de la lécithine<sup>185,186</sup>.

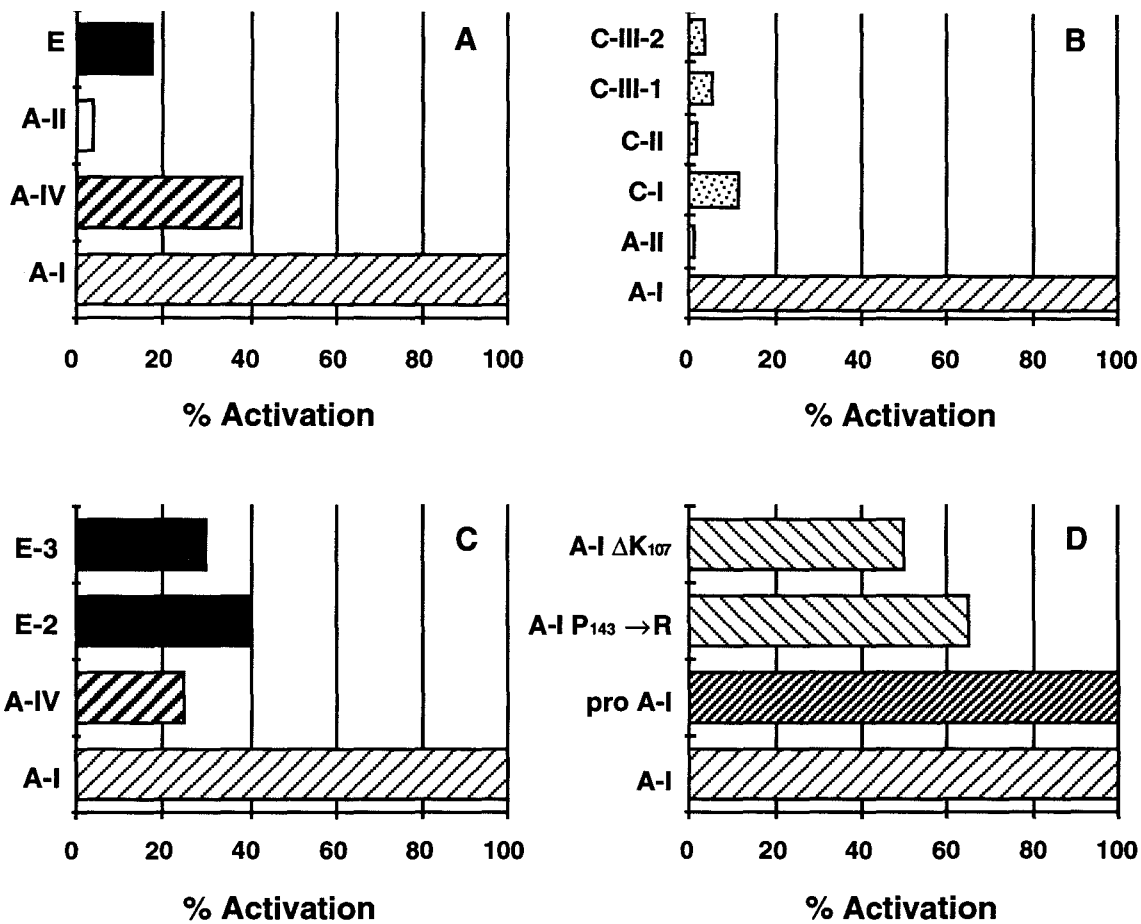
### 3.1.2. Activation de la LCAT par les apolipoprotéines

En utilisant de la LCAT partiellement purifiée et des apolipoprotéines isolées de HDL, Fielding et coll. ont été les premiers à mettre en évidence l'activation marquée de la LCAT par de l'apolipoprotéine A-I co-soniquée avec de la phosphatidylcholine extraite d'oeuf et du cholestérol. En utilisant des techniques de reconstitution d'HDL mieux contrôlées, les potentiels d'activation de la LCAT des autres apolipoprotéines ont également été déterminés. Les résultats des différentes équipes de recherches sont résumés sur la **figure 22**. Ces études montrent que si l'apoA-I constitue bien l'activateur principal de la LCAT, d'autres apolipoprotéines, telle l'apoA-IV, sont également capables d'activer cette enzyme de façon significative. Cependant, l'activation de la LCAT par l'apoA-IV ne représente que 25 à 38% de celle obtenue avec l'apoA-I. La nature du phospholipide utilisé pour la reconstitution des HDL semble également jouer un rôle important<sup>43</sup>. Enfin, la conformation de l'apolipoprotéine ainsi que l'interaction lipides-protéine constituent des facteurs importants dans l'activation de la LCAT, ainsi que le montrent les données suivantes:

- Les niveaux d'activation observés avec des particules composées d'apolipoprotéines différentes mais physico-chimiquement proches suggèrent l'existence d'une structure optimale de l'apolipoprotéine A-I pour l'activation de cette enzyme<sup>35</sup>.
- La modification chimique de l'apoA-I par des réactifs intervenant sur les fonctions amines libres (90% des résidus de lysine modifiés en diméthyl-lysine) n'entraîne ni modification de structure de l'apoA-I, ni de différence de réactivité vis-à-vis de la LCAT. En revanche, une modification des résidus chargés de l'apoA-I induit des modifications structurales de la protéine et implique un effet négatif sur l'activation de la LCAT<sup>187</sup>.

• L'apoA-I possède différentes conformations dans des complexes discoïdaux de diamètres variables (10, 20, 38 nm) obtenus avec du DPPC, du cholestérol et de l'apoA-I. Or, ces disques possèdent des capacités différentes d'activation de la LCAT, les plus petits ayant un potentiel d'activation supérieur<sup>188</sup>.

Ces trois faits montrent que la conformation de l'apoA-I et l'association avec les phospholipides qu'elle détermine, jouent un rôle fondamental dans l'activation de la lécithine cholestérol acyl transférase.



**Figure 22. Apolipoprotéines activatrices de la LCAT.**

Pour les quatre études, une activation de la LCAT de 100% est arbitrairement affectée à l'apoA-I humaine.

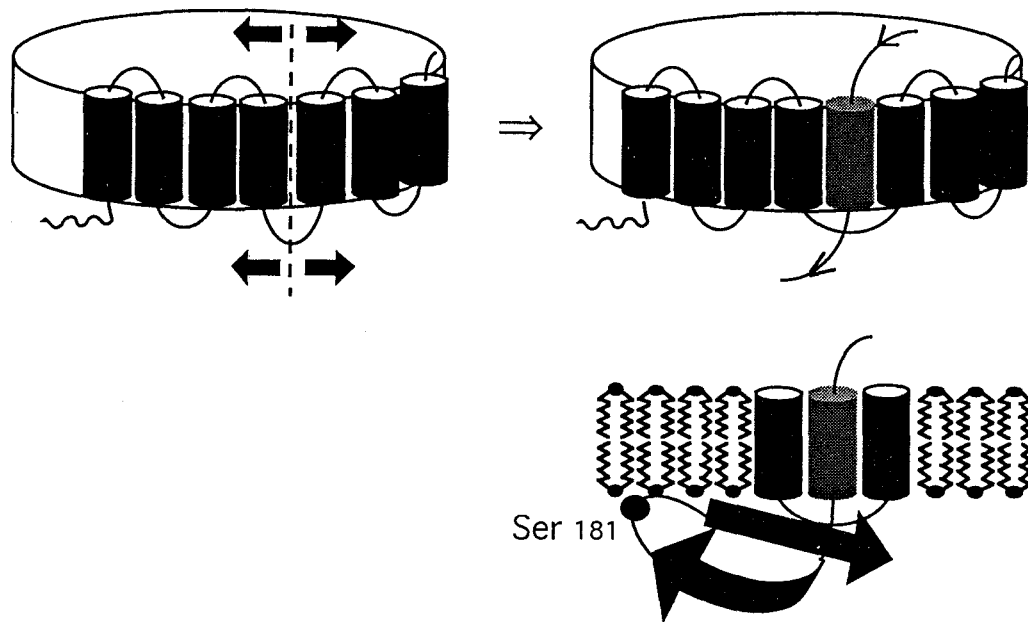
A: HDL discoïdales reconstituées par sonication<sup>43,189,190</sup>. B, C : HDL discoïdales reconstituées par la méthode au cholate<sup>191</sup>, D: vésicules de Egg-PC/chol.<sup>171,173,172</sup>

### 3.1.3. Mécanisme de l'activation

La localisation d'un domaine de l'apoA-I responsable de l'activation de la LCAT a fait l'objet de nombreuses études. Certains peptides synthétiques et fragments CNBr de l'apoA-I ainsi que certaines apolipoprotéines échangeables sont capables d'activer la LCAT, suggérant ainsi qu'aucun domaine particulier de l'apoA-I n'est spécifiquement mis en jeu. Cependant, ces différentes séquences non homologues ou fragments ne sont capables de réaliser qu'au maximum 40 % de l'activation obtenue avec l'apoA-I native. En conséquence, de nombreuses équipes ont cherché à déterminer s'il existe sur l'apoA-I un site particulier qui interviendrait de façon privilégiée dans l'activation de la LCAT.

Des études immunologiques menées par Banka et coll.<sup>192</sup> suggèrent que le domaine d'activation de la LCAT se situe entre les résidus 95 et 121 de l'apoA-I. D'autres auteurs<sup>193</sup> aboutissent également à des conclusions comparables. Ainsi, la région correspondant à l'hélice 5 (résidus 99-120) de l'apoA-I est très souvent désignée comme étant impliquée dans l'activation de la LCAT. D'autres équipes de recherches<sup>194</sup> proposent, sur la base de l'utilisation de mutants d'apoA-I obtenus par mutagenèse dirigée, que la région responsable de l'activation de la LCAT par l'apoA-I se situerait plutôt au niveau des hélices 7 et 8 (résidus 143-186) de cette apolipoprotéine. Cependant, une étude similaire<sup>180</sup> réalisée avec un mutant pour lequel ce domaine était délété, n'a pas permis de confirmer l'importance de cette séquence sur l'activité LCAT.

Le mécanisme d'activation de la LCAT par l'apoA-I reste à ce jour inconnu. La mise en évidence d'une fixation spécifique de la lipoprotéine lipase sur son activateur physiologique (apo C-II)<sup>195,196</sup>, ainsi que la résolution récente de la structure cristalline d'un complexe lipase pancréatique/colipase<sup>197</sup> ont suggéré que le rôle de l'apoA-I pourrait consister à aider l'association de l'enzyme avec l'interface substrat. Une interaction LCAT/apoA-I serait dans ce cas à l'origine de l'activation de l'enzyme. Une hypothèse séduisante a été récemment avancée par Fielding et Fielding<sup>66</sup>. Ces auteurs se sont intéressés au fragment 154-174 de la LCAT qui, selon les règles de prédiction de Chou et Fasman, correspondrait à une région hélicoïdale. Sur la base de comparaisons de séquences, Fielding et Fielding ont proposé que ce fragment pourrait constituer un point d'ancrage de l'enzyme vis à vis des HDL naissantes. Le modèle qu'ils proposent (**figure 23**) consiste en l'insertion du fragment 154-174 de la LCAT à la périphérie d'une HDL discoïdale. Cette insertion serait facilitée par l'interaction électrostatique de cette hélice avec l'hélice 143-163 de l'apoA-I. D'après les auteurs, cet ancrage de l'enzyme permettrait le positionnement idéal du site actif de la LCAT à l'interface lipidique substrat. Ce modèle reste cependant spéculatif et une autre étude fait état d'une fixation de la LCAT indépendante de la composition en apolipoprotéines des HDL<sup>198</sup>. Pour ses auteurs, l'accessibilité de l'enzyme serait plutôt fonction de la nature des lipides de l'interface substrat.



**Figure 23. Modèle hypothétique d'interaction de la LCAT avec l'apoA-I dans les HDL naissantes du plasma humain<sup>66</sup>.**

En haut à gauche : déplacement d'unités de répétition centrales de l'apoA-I (en noir), en haut à droite : insertion du segment 154-174 de la LCAT (en gris), en bas à droite : alignement du site actif en feuillet  $\beta$  de la LCAT et positionnement de la serine 181.

### 3.2. Interaction avec la membrane cellulaire

Les HDL possèdent la propriété de se fixer de façon spécifique sur la membrane plasmique de nombreux types cellulaires. Toutefois, le mécanisme par lequel elles interagissent avec la membrane n'est pas connu à ce jour et les hypothèses proposées restent controversées. Globalement, 2 grandes théories sont proposées :

- Certains auteurs estiment que la fixation des HDL au niveau de la membrane fait intervenir une interaction classique de type récepteur/ligand entre une protéine membranaire et une ou plusieurs apolipoprotéines des HDL. Un certain nombre de protéines candidates sont d'ailleurs décrites.

- D'autres auteurs pensent qu'une telle interaction de type récepteur/ligand n'existe pas et que la fixation des HDL fait intervenir un mécanisme d'affinité entre une ou plusieurs apolipoprotéines et la double couche lipidique de la membrane cellulaire.

Il faut nécessairement distinguer les interactions HDL/hépatocytes ou HDL/tissus stéroïdogéniques des interactions HDL/cellules périphériques (extra-hépatiques). En effet ces deux interactions ne possèdent pas la même signification du point de vue métabolique. L'interaction HDL/cellules périphériques intervient au début du mécanisme de transport inverse du cholestérol et certains auteurs pensent qu'une telle interaction est nécessaire pour l'induction de l'efflux du cholestérol des cellules vers les lipoprotéines. En revanche, une interaction HDL/cellules hépatiques ne peut avoir un sens que dans la phase finale de ce mécanisme, lors de la restitution au foie du cholestérol estérifié contenu dans les HDL. De même, les interactions impliquant les HDL au niveau des tissus stéroïdogéniques non placentaires concernent également la charge de ces cellules en esters de cholestérol afin qu'elles soient en mesure de synthétiser des hormones stéroïdiennes.

### 3.2.1. Interaction spécifique HDL-cellules hépatiques

De nombreuses études font état d'une interaction spécifique des HDL avec la membrane de cellules hépatiques. Il est vraisemblable qu'*in vivo*, les HDL contenant de l'apolipoprotéine E soient captées par le foie grâce aux récepteurs E ou B/E. Cependant, de nombreuses équipes de recherche ont mis en évidence la fixation spécifique d'HDL ne contenant pas d'apo E sur des membranes cellulaires hépatiques<sup>199.200.201.202.203</sup> et sur des cellules hépatiques intactes (isolées<sup>106.204</sup> ou en culture<sup>105</sup>). La plupart de ces études montrent que l'apoA-I constitue le ligand préférentiel des protéines de fixation hépatiques, d'autres font état d'une fixation des apoA-II et A-IV. Vadiveloo et coll.<sup>22</sup> estiment que le manque de spécificité de ces protéines de fixation des HDL provient d'un mode de reconnaissance atypique du ligand. Selon eux, de telles protéines seraient capables de reconnaître, non pas une séquence particulière, mais un type de structure donné. Les unités de répétition  $\alpha$ -hélicoïdales présentes sur les apolipoprotéines A-I, A-IV, et A-II seraient concernées par cette reconnaissance. Ainsi, des HDL prétraitées au tétranitrométhane (déstructurant des hélices  $\alpha$ ), n'entrent plus en compétition avec les HDL natives sur les cellules HepG2<sup>205</sup>. D'autre part, plusieurs anticorps dirigés contre les régions en hélice- $\alpha$  de l'apoA-I sont capables d'inhiber la fixation des HDL sur ces mêmes cellules. Enfin, l'importance de la structure en hélice  $\alpha$  au sein des HDL est également suggérée par d'autres données démontrant l'implication de l'extrémité C-terminale de l'apoA-I, riche en hélices, dans l'interaction de cette apolipoprotéine avec les protéines hépatiques de fixation des HDL<sup>202</sup>.

Des efforts importants ont été réalisés dans le but de purifier ces protéines hépatiques de fixation des HDL. Les résultats de ces études sont résumés dans le **tableau 12**. Ainsi Bond et coll.<sup>206</sup>, Tozuka et Fidje<sup>207</sup>, De Crom et coll.<sup>208</sup> font état d'une protéine de 100 kDa capable de



fixer les HDL. Certains euteurs détectent également la présence d'une autre protéine de poids moléculaire supérieur (180 kDa). Toutes ces protéines fixent l'apolipoprotéine A-I associée aux lipides.

**Tableau 12. Principales protéines hépatiques possédant la capacité de fixer de manière spécifique des HDL natives ou reconstituées.**

Origine des tissus ou lignée cellulaire, masse moléculaire et références.

Source cellulaire	Nombres de protéines.	Masse moléculaire (kDa)	Ligands	Référence
Foie de porc	2	90 et 180	HDL	De Crom et coll. (1992) <sup>208</sup>
Foie de rat	2	120 et 100	HDL, LpA-I LpA-II	Tozuka et Fidje(1991) <sup>207</sup> Vadiveloo et coll. (1993) <sup>22</sup>
Hep 3B	1	100	HDL	Bond et coll. (1991) <sup>206</sup>

Dans un article récemment paru dans Nature<sup>104</sup>, Acton et coll. montrent qu'un mécanisme impliquant un récepteur (SR-BI) permet la fixation des HDL à la membrane des cellules hépatiques et le passage du cholestérol estérifié dans la cellule, sans internalisation de la particule. Le cholestérol estérifié pourrait ensuite être pris en charge par un accepteur à l'intérieur de la cellule. Les auteurs montrent que ce récepteur ne s'exprime pas au niveau des cellules périphériques.

Il est donc démontré qu'il existe au niveau des cellules hépatiques plusieurs protéines capables de fixer de manière spécifique les HDL dépourvues d'apo E. Bien qu'une spécificité large de ces protéines soit observée (fixation de l'apoA-I, apoA-II et de l'apoA-IV), il semble que l'apolipoprotéine A-I joue un rôle important dans ces phénomènes d'interaction entre HDL et cellules hépatiques.

### 3.2.2. Interaction spécifique HDL-cellules périphériques

Depuis longtemps, il est connu que les HDL sont capables de fournir du cholestérol estérifié aux tissus stéroïdogéniques afin d'alimenter les synthèses d'hormones stéroïdiennes<sup>15,209</sup>. Cependant, d'autres cellules périphériques sont également capables de fixer spécifiquement les HDL. De nombreuses équipes de recherche ont, en effet, mis en évidence que certaines membranes cellulaires extra-hépatiques<sup>16,210</sup> et certaines cellules intactes (isolées<sup>211,212</sup> ou en culture<sup>20</sup>) sont capables de fixer de façon spécifique des HDL dépourvues d'apo E. Les différentes caractéristiques de cette fixation sont les suivantes :

- La fixation est spécifique des apolipoprotéines A-I, A-II, et A-IV.
- La fixation ne dépend pas du récepteur LDL (apo B/E).
- La fixation peut être réversible et régulée par des hormones<sup>213</sup>.
- La fixation est inhibée quand les HDL sont prétraitées par des agents chimiques qui pontent de façon covalente les apolipoprotéines entre elles<sup>214</sup>.
- La fixation est stimulée par l'enrichissement des cellules avec des stéroïdes exogènes ou un traitement cellulaire avec du 25-hydroxycholestérol<sup>215,216</sup>.

Des efforts importants ont été entrepris pour tenter de purifier ces protéines de fixation. Les résultats de ces études sont résumés dans le **tableau 13**. Parmi ces protéines, l'une d'elle, appelée HBP<sup>14</sup> pour *HDL Binding Protein*, fixe les HDL, les LpA-I et LpA-II, et est actuellement considéré par de nombreuses équipes de recherche comme le principal candidat récepteur HDL au niveau des cellules périphériques. Cependant, la structure primaire de cette HBP ne ressemble à aucun type de récepteurs connus.

**Tableau 13. Principales protéines extra-hépatiques possédant la capacité de fixer de manière spécifique des HDL natives ou reconstituées.**  
Origine des tissus ou lignée cellulaire, masse moléculaire et références.

Source cellulaire ou membranaire.	Nombre de protéines.	Masse moléculaire (kDa)	Ligands	Référence
Cortex adrénalien de mouton	1	78	HDL	Fidge et coll. <sup>217</sup> (1985)
Rein de rat	1	78	HDL3	Fidge et coll. <sup>218</sup> (1987)
Fibroblastes humains Fibroblastes murins Cellules musculaires lisses Cellules endothéliales bovines	1 (HBP)	110	HDL Egg PC/A-I Egg PC/A-II	Graham et Oram. <sup>14</sup> (1987)
Macrophages J774	1	110	HDL ApoA-I	Monaco et coll. <sup>219</sup> (1987)
Cellules placentaires humaines	1	120	HDL ApoA-I	Keso et coll. <sup>220</sup> (1987)
Fibroblastes humains	1	16	HDL3	Mendel et coll. <sup>221</sup> (1988)
Cellules ovariennes de rat	1	58	HDL	Ferreri et Menon <sup>222</sup> (1990)
Adipocytes OB1771	2	92 et 80	HDL, A-I, A-II, A-IV	Barbaras et coll. <sup>223</sup> (1990)

Comme dans le cas du foie, les protéines de fixation des HDL mises en évidence sur les cellules extra-hépatiques semblent posséder une affinité importante pour l'apolipoprotéine A-I. Pourtant, la spécificité de ces protéines de fixation semble large puisque l'apoA-II et l'apoA-IV peuvent également être reconnues. Toutefois, Luchoomun et coll.<sup>20</sup> ont montré par des expériences de compétition avec des anticorps monoclonaux que la région 149-186 de l'apoA-I semble importante pour la fixation de complexes POPC/apoA-I sur des cellules épithéliales humaines. Cette hypothèse a récemment été confirmée par Sviridov et coll.<sup>18</sup> qui, en utilisant d'autres anticorps monoclonaux, concluent également à l'importance de ce domaine de l'apoA-I pour la fixation des HDL sur les cellules périphériques.

Un modèle proposé par Schmitz et coll.<sup>224,225</sup> en 1985 indique que, pour certains types cellulaires, une quantité substantielle d'HDL fixée sur la membrane plasmique est endocytée puis sécrétée à la surface de la cellule. Cette rétroendocytose, mise en évidence par la technique de marquage à l'or colloïdal, n'a cependant pas été confirmée depuis. Il est probable que les complexes HDL/protéine membranaire soient en fait endocytés puis rétroendocytés avec un renouvellement rapide semblable à celui mis en oeuvre pour régénérer la membrane plasmique des macrophages (3% par min). Un tel taux de régénération rapide impliquerait que pratiquement tous les complexes HDL/protéines de fixation soient présents à la surface des cellules comme le montrent Oram et coll.<sup>226</sup> avec des HDL marquées à l'iode radioactif. En revanche, la technique à l'or colloïdal pourrait retarder ce processus cyclique non spécifique par l'encombrement stérique qu'elle impose et ainsi expliquer l'accumulation des HDL dans les endosomes constatée par Schmitz et coll.<sup>224</sup>.

### 3.2.3. Interaction mixte apoA-I/lipides membranaires

Une alternative a été proposée pour expliquer le mécanisme de l'interaction HDL/cellule périphérique. Cette hypothèse repose sur une étude portant sur L'HPL (*Human Placental Lactogen*), hormone dont la libération est stimulée par l'incubation d'HDL avec des explants placentaux humains. Cette activité biologique semble due aux apolipoprotéines A-I, A-II, et C<sup>227</sup>. Jorgenson et coll.<sup>228</sup> ont démontré qu'une hélice amphipathique synthétique (18A) est également capable de provoquer la libération de l'HPL après incubation avec des trophoblastes. De plus, ils montrent que le degré de libération de l'hormone est corrélé avec l'affinité pour les lipides du peptide employé. Cette étude suggère donc que le rôle des apolipoprotéines dans la libération de l'HPL passerait par une interaction des hélices amphipathiques avec les phospholipides de la membrane cellulaire.

Une étude immuno-chimique de Leblond et Marcel<sup>21</sup> évoque également la possibilité d'une interaction des hélices amphipathiques de l'apoA-I avec la double couche lipidique de la membrane cellulaire de cellules HepG2. Un autre travail présenté par Davidson et coll.<sup>87</sup> avance également l'hypothèse d'une interaction apolipoprotéine/membrane plasmique transitoire, et non spécifique, pour expliquer les différences observées entre les vitesses maximales d'efflux obtenues en présence de DMPC/A-I et de vésicules unilamellaires de DMPC. Ce type de liaison permettrait d'expliquer la faible spécificité de l'interaction HDL/membrane cellulaire.

### 3.2.4. Interaction de type lipidique

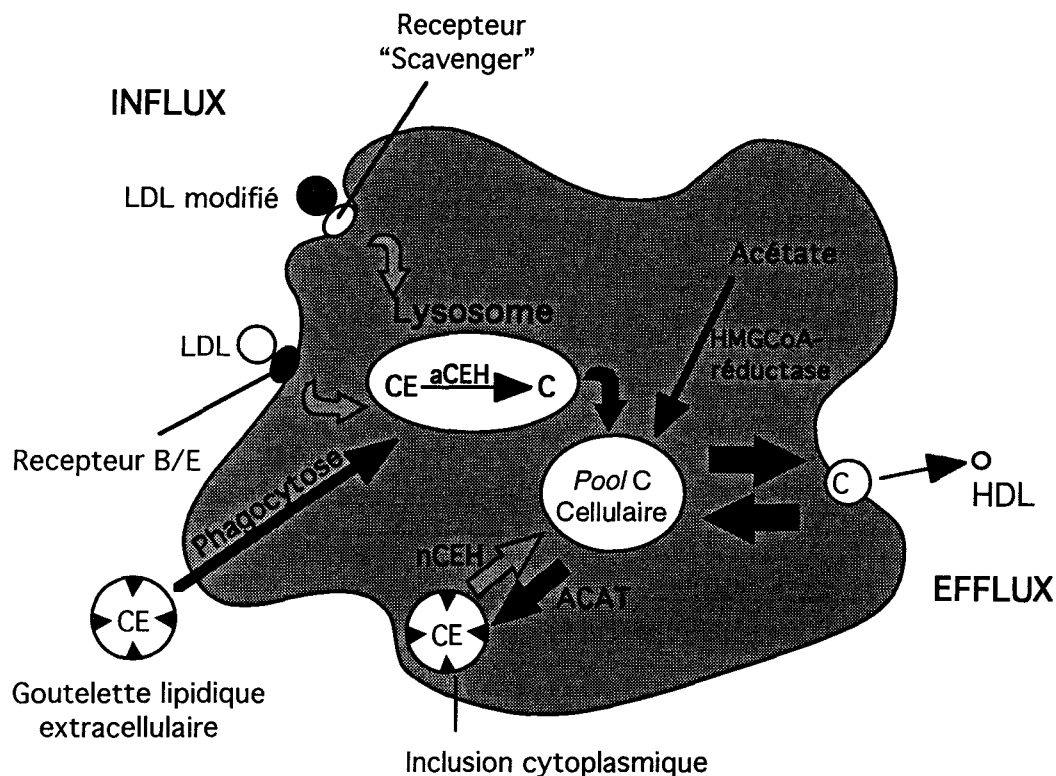
Comme nous l'avons dit plus haut, les lipoprotéines de haute densité sont capables d'interagir avec de nombreux types cellulaires. Afin de déterminer la nature de cette interaction, Tabas et Tall<sup>90</sup> ont utilisés des HDL<sub>3</sub> trypsinées à 60% (T-HDL<sub>3</sub>) dans des expériences de fixation sur trois types cellulaires différents. De façon surprenante, ils constatent que les T-HDL<sub>3</sub> se fixent plus facilement sur les 3 types cellulaires que les HDL<sub>3</sub> non traitées par l'enzyme. De plus, ils montrent que lors d'expériences de compétition les T-HDL<sub>3</sub> sont capables de déplacer les HDL<sub>3</sub> natives plus efficacement que les HDL<sub>3</sub> elles mêmes. Des études similaires<sup>229,230</sup> montrent qu'une trypsination partielle des LDL (à 20%) suffit pour inhiber la compétition entre LDL et T-LDL pour le récepteur LDL. Tabas et Tall<sup>90</sup> proposent donc que l'interaction protéine/protéine intervenant classiquement dans le cadre d'une liaison récepteur/ligand n'est pas mise en jeu lors de la fixation des HDL<sub>3</sub> sur les fibroblastes et sur d'autres cellules périphériques. Ils suggèrent que cette fixation passe par une interaction lipide/lipide mettant en jeu, d'une part, des agglomérats membranaires de cholestérol et, d'autre part, la surface lipidique des HDL<sub>3</sub>. D'autres observations viennent étayer cette hypothèse :

- La corrélation directe<sup>231</sup> qui existe entre le contenu intracellulaire en cholestérol (et par conséquent membranaire<sup>232</sup>) et la capacité de la cellule à interagir avec les HDL<sub>3</sub>. Cette corrélation est confirmée par le blocage de l'interaction HDL<sub>3</sub>/cellule en présence de cycloheximide qui empêche la formation du cholestérol libre cellulaire<sup>216</sup>.

- Jackson et coll.<sup>233</sup> mettent en évidence une interaction HDL<sub>3</sub>, DMPC/A-I ou A-II/cellules endothéliales, intervenant sans internalisation et de façon non dissociable par traitement trypsique.

### 3.3. Efflux de cholestérol

Dans la cellule, le cholestérol est distribué dans de nombreux compartiments cellulaires incluant les vésicules lysosomales et microsomales, et la membrane plasmique (**figure 24**).



**Figure 24. Métabolisme du cholestérol dans les cellules de mammifères.**

Les cellules acquièrent le cholestérol par endocytose (pinocytose ou phagocytose) de cholestérol estérifié (CE) et par synthèse "de novo" (voie de l'acétate via l'HMGCoA-réductase). La biosynthèse et la dégradation du cholestérol estérifié exogène alimentent de nombreux *pools* intracellulaires de cholestérol (C). Un échange continu entre CE et C est assuré par voie enzymatique via l'ACAT (acylCoA:cholestérol acyltransférase) et la nCEH (*neutral cholesteryl ester hydrolase*). Un transport vers la membrane plasmique rend le cholestérol disponible pour l'efflux vers la fraction HDL du liquide interstitiel.

De nombreuses études montrent le rôle prépondérant de l'apolipoprotéine A-I dans le métabolisme du cholestérol. Outre le fait qu'elle active la LCAT, l'apoA-I est désignée par de nombreux groupes de recherche comme participant de façon active à l'efflux de cholestérol. Même s'il est désormais établi qu'une certaine proportion de cet efflux est diffusionnelle, l'existence d'une composante d'efflux spécifique est soutenue par de nombreuses équipes qui s'appuient sur les données suivantes :

- La fixation spécifique des HDL aux cellules périphériques entraîne la translocation du cholestérol des membranes intracellulaires vers la membrane plasmique de la cellule<sup>234</sup>. Or cette fixation met en jeu, entre autres, l'apolipoprotéine A-I.

- L'émission d'un second messenger intracellulaire, le 1,2-diacylglycérol, après la fixation des HDL<sub>3</sub> sur certaines cellules permettrait la translocation du cholestérol du *pool* intracellulaire de cholestérol vers la membrane plasmique<sup>235</sup>. Cette émission nécessite la fixation des HDL<sub>3</sub> et en particulier de l'apoA-I. Elle serait corrélée à la transduction transitoire de protéines kinases C vers la membrane.

- L'étude de variants naturels de l'apoA-I a montré que des mutations peuvent affecter l'efflux de cholestérol<sup>19</sup> dans la proportion de 30% d'efflux en moins par rapport à l'apoA-I native. La région concernée par la mutation constituerait un domaine important pour l'efflux de cholestérol membranaire des cellules périphériques.

- De nombreuses études<sup>36,236</sup> font état d'une spécificité accrue de l'efflux pour les LpA-I par rapport aux LpA-I:A-II et en particulier pour les pré-β1 HDL<sup>70</sup> pauvres en lipides. Une conformation particulière de l'apoA-I pourrait définir un site d'accueil pour les stérols au sein de ces particules.

- Une étude effectuée sur des souris transgéniques pour l'apoA-I humaine indique que l'expression d'apoA-I humaine chez la souris induit un efflux de cholestérol plus important que chez les souris témoins et également une protection de ces souris contre l'athérosclérose<sup>237</sup>.

Cependant, d'autres auteurs contestent le rôle prédominant de l'apoA-I dans l'efflux de cholestérol. En particulier, le groupe de Phillips soutenu par celui de Rothblat défend une hypothèse exclusivement diffusionnelle de l'efflux de cholestérol<sup>87</sup>. Ces auteurs s'appuient, entre autres, sur les résultats obtenus en collaboration avec le groupe de Segrest qui montrent qu'il est possible d'induire un efflux de cholestérol important en utilisant le peptide synthétique 18A ou ses dérivés<sup>238</sup>.

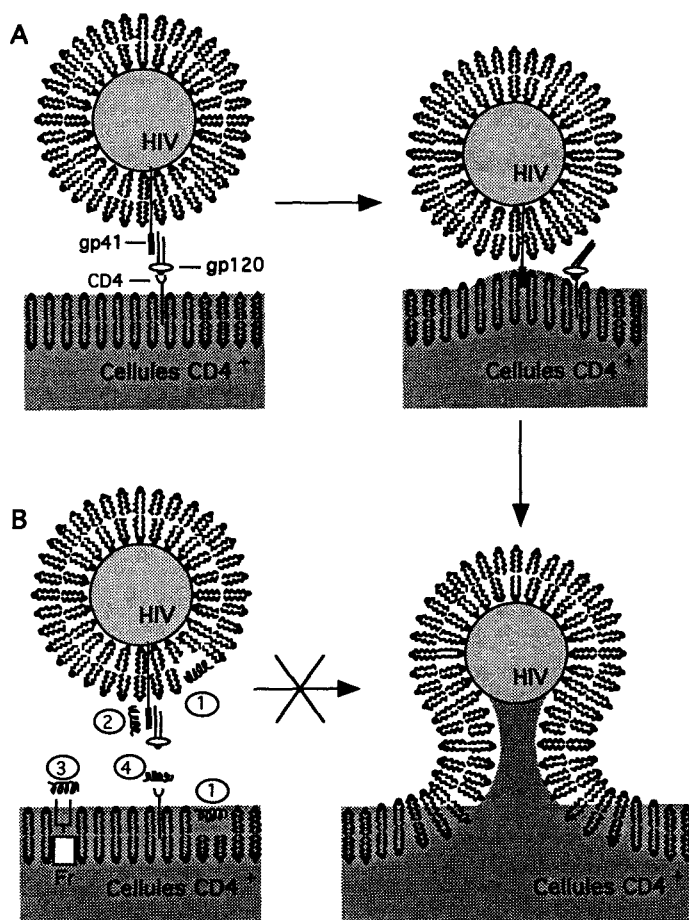
### **3.4. Autres propriétés de l'apolipoprotéine A-I**

#### **3.4.1. Activation de la mobilité spermatozoïque**

L'activation de la mobilité spermatozoïque par le sérum humain est connue depuis très longtemps. Il est d'ailleurs utilisé en association avec les préparations de sperme lors des

expériences de fécondation *in vitro*. Récemment, un groupe de recherche a pu mettre en évidence le facteur responsable de cette activation<sup>239</sup>. Il s'agit d'un complexe moléculaire de 250 kDa composé d'une molécule d'albumine d'une part, d'apoA-I et d'immunoglobulines (chaînes lourdes et légères) en quantité équimolaire, d'autre part. Cette SAP (*Sperm Activating Protein*) n'est active que sous forme macromoléculaire. Son mécanisme d'action n'est pas encore connu, mais compte tenu des faibles concentrations nécessaires pour cette activation, un mécanisme récepteur dépendant ou associé à une activité enzymatique n'est pas exclu.

### 3.4.2. Perturbation de la fusion membranaire des virus



**Figure 25. :** Modèle proposé pour expliquer l'inhibition de la fusion membranaire du virus HIV par les hélices amphipathiques de l'apoA-I<sup>240</sup>. (A) : fusion en absence du traitement peptidique. Après interaction entre la gp120 et le récepteur CD4, la gp41 perturbe probablement la bicouche lipidique entraînant la fusion membranaire. (B) : l'hélice amphipathique de l'apoA-I pourrait intervenir en plusieurs endroits : ① perturbation de la bicouche, ② interaction avec le domaine fusogène, ③ interaction avec un récepteur spécifique de fusion (fr), ④ compétition avec la gp120 pour la fixation sur le CD4.

L'infection cellulaire par les rétrovirus comme le HIV s'effectue par un mécanisme de fusion entre la membrane du virus et celle de la cellule cible. Des agents possédant une affinité importante pour les membranes cellulaires sont capables d'inhiber cette fusion membranaire. En particulier de récents rapports mettent en évidence la capacité de protéines possédant des pourcentages importants d'hélices amphipathiques à intervenir au niveau de certaines glycoprotéines membranaires virales. Ainsi, l'intervention de l'apolipoprotéine A-I dans l'inhibition de l'infection du virus HIV a été suggérée<sup>240</sup> et un mécanisme possible pour expliquer cette inhibition est présenté sur la **figure 25**. L'activité inhibitrice de l'apoA-I sur la fusion membranaire des virus a, par la suite, été confirmée en utilisant le virus de l'herpès<sup>241</sup> comme modèle.



**Seconde Partie**  
**Résultats Expérimentaux**

## CHAPITRE III. ASSOCIATION DE FRAGMENTS SYNTHETIQUES D'APOA-I HUMAINE AVEC DES PHOSPHOLIPIDES

### 1. INTRODUCTION

La synthèse peptidique constitue un outil de choix pour étudier les domaines fonctionnels des protéines. Dans le cas de segments hélicoïdaux courts d'apolipoprotéine, une telle étude n'a de sens que si elle peut être réalisée dans l'environnement physico-chimique de la protéine dans le plasma, c'est-à-dire associée à des lipides au sein des HDL. De nombreuses études menées avec des fragments d'apolipoprotéines naturels<sup>147.256</sup> ou synthétiques<sup>124.242</sup> ou encore à l'aide d'analogues synthétiques<sup>243.120</sup> soulignent l'importance des unités de répétition hélicoïdales des apolipoprotéines échangeables dans l'association avec les lipides au sein des HDL. Pourtant, la reconstitution d'HDL à l'aide de segments hélicoïdaux spécifiques, isolés d'apolipoprotéines, n'avait encore jamais été étudiée. Afin de définir la structure et le potentiel de reconstitution d'HDL de ces unités de répétition, nous avons choisi de synthétiser trois segments issus de l'apolipoprotéine A-I humaine dont les séquences sont présentées dans la **figure 1**.

#### Peptide apoA-I [166-183]

166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179
Tyr	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu
180	181	182	183										
Ala	Leu	Lys	Glu										

#### Peptide apoA-I [161-183]

161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174
Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu
175	176	177	178	179	180	181	182	183					
Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu					

#### Peptide apoA-I [145-183]

145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Arg	Ala	Arg	Ala	His	Val	Asp	Ala
159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172
Leu	Arg	Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Gln
173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183			
Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu			

**Figure 1.** Structure primaire des fragments [161-183], [166-183] et [145-183] de l'apolipoprotéine A-I humaine (code 3 lettres des acides aminés).

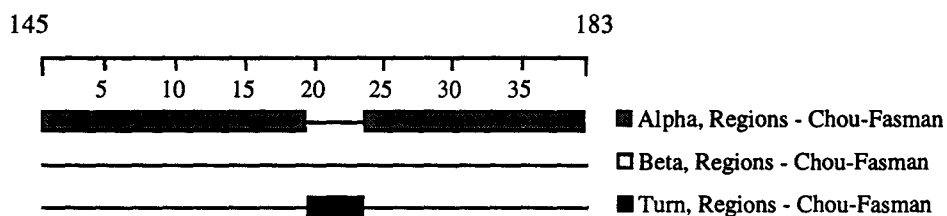
Le choix de la séquence 145-183 de l'apoA-I dérive d'abord de considérations d'ordre biologique. Cette séquence apparaît impliquée dans l'interaction des HDL avec les cellules<sup>20</sup> et pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'efflux de cholestérol des cellules périphériques<sup>19</sup> vers les HDL. D'autre part, des considérations d'ordre physico-chimique sont venues corroborer ce choix. En effet, l'unité de répétition 145-183 de l'apoA-I est prédite comme étant l'une des plus stable à l'interface lipidique<sup>135</sup>.

Dans le but de vérifier que ces séquences présentent effectivement un intérêt physico-chimique important pour la reconstitution d'HDL discoïdales synthétiques, nous avons, dans un premier temps, utilisé les outils de prédiction de structure classique. De plus, dans le cadre d'une collaboration engagée avec le docteur Brasseur de la faculté agronomique de Gembloux, nous avons utilisé le programme Prot<sup>+</sup>/Tammo afin de prédire l'organisation structurale de ces peptides à l'interface lipidique.

## 2. PREDICTION STRUCTURALE ET MODELISATION MOLECULAIRE

### 2.1. Utilisation des méthodes prédictives classiques

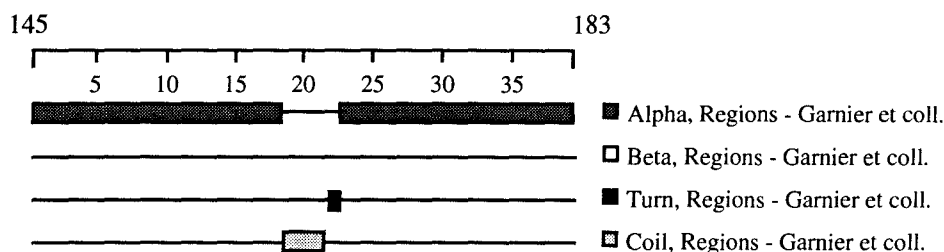
La méthode de Chou et Fasman<sup>117</sup> dérive d'une étude statistique sur la fréquence d'apparition des 20 acides aminés naturels dans 64 protéines différentes de structure connue. Appliquée à la séquence 145-183 de l'apoA-I, l'analyse (**figure 2**) met en évidence la présence de deux segments  $\alpha$ -hélicoïdaux (145-163) et (168-183) séparés par une courte région de quatre acides aminés possédant une structure proche du coude  $\beta$  (164-167).



**Figure 2.** Analyse prédictive de la structure secondaire du fragment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I humaine selon Chou et Fasman<sup>117</sup>.



La méthode selon Garnier et coll.<sup>118</sup> est également basée sur un traitement statistique de la présence de chaque acide aminé au sein de 26 protéines de structure connue. L'analyse (**figure 3**) met en évidence la présence potentielle de deux segments  $\alpha$ -hélicoïdaux (145-162) et (167-183) séparés par une courte région de quatre acides aminés possédant une structure prédite en pelote statistique (163-166).



**Figure 3. Analyse prédictive de la structure secondaire du fragment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I humaine selon Garnier et coll.<sup>118</sup>.**

La représentation de "Schiffer-Edmunson"<sup>119</sup> permet d'apprécier le caractère potentiellement amphipathique d'une structure  $\alpha$ -hélicoïdale. Les acides aminés sont inclus au sein d'une structure en hélice  $\alpha$  idéale représentée en vue axiale, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Sur la représentation (**figure 4**), on observe effectivement pour les 2 hélices prédites par Garnier et coll.<sup>118</sup> une ségrégation des résidus non-polaires (V,L,M,A) et des résidus polaires (R,N,Q,K,E,D) augurant d'une amphipathicité potentielle importante des 2 hélices.

L'analyse selon Chou et Fasman<sup>117</sup> montre la probabilité de présence d'une structure en coude  $\beta$  entre les 2 hélices. La méthode de Garnier et coll.<sup>118</sup> suggère plutôt une structure en pelote statistique. Afin d'avoir une idée plus précise de la structure de cette zone d'articulation, nous avons utilisé une méthode de prédiction plus spécifique. Sur la base d'une étude statistique prenant en compte les différents types de coudes  $\beta$  au sein d'un groupe de 59 protéines de structure RX connue, Wilmot et Thornton<sup>244</sup> ont constitué un classement de ces coudes  $\beta$  en fonction des angles  $\Phi$  et  $\Psi$  des résidus  $i+1$  et  $i+2$  appartenant au coude. Ils les ont désigné par les appellations coudes  $\beta$  de type I ( $\Phi_{i+1}=-60^\circ$   $\Psi_{i+1}=-30^\circ$ ,  $\Phi_{i+2}=-90^\circ$   $\Psi_{i+2}=0^\circ$ ), coudes  $\beta$  de type II ( $\Phi_{i+1}=-60^\circ$   $\Psi_{i+1}=120^\circ$ ,  $\Phi_{i+2}=80^\circ$   $\Psi_{i+2}=0^\circ$ ) et coudes  $\beta$  non spécifiques pour tout coude ne présentant pas les caractéristiques du type I ou du type II.

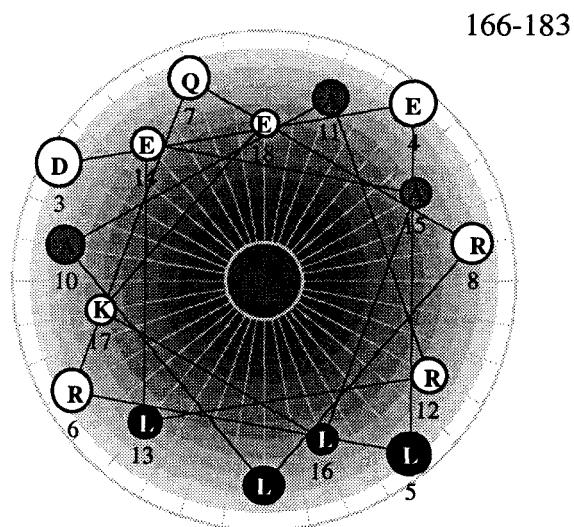
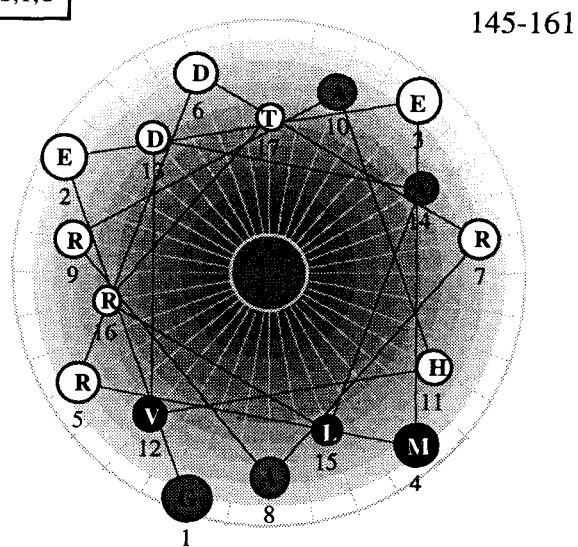
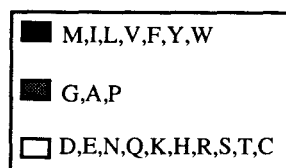
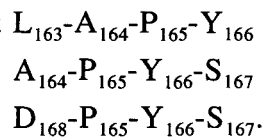


Figure 4. Représentation de "Schiffer-Edmunson" des séquences 145-161 et 166-183 de l'apolipoprotéine A-I humaine<sup>119</sup>.

Appliquée à la séquence 162-168 (tableau 1), l'analyse montre qu'une structuration en coude  $\beta$  de type I semble peu probable dans cette région. En revanche, l'enchaînement  $A_{164}-P_{165}-Y_{166}-S_{167}$  pourrait se structurer en un coude  $\beta$  de type II. L'analyse montre également des possibilités de structuration en coude  $\beta$  non spécifique (avec cependant une moindre probabilité) au niveau des trois séquences suivantes :



**Tableau 1. Analyse structurale prédictive de la séquence 162-168 de l'apoA-I humaine selon Wilmot et Thornton<sup>244</sup> : prédiction des coudes  $\beta$  de type I, II et non spécifique.**

A chaque acide aminé en position  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+2$ , et  $i+3$  correspond une fréquence ( $f$ ) d'apparition  $f(i)$ ,  $f(i+1)$ ,  $f(i+2)$ ,  $f(i+3)$  dans une structure en coude  $\beta$ . Si le produit  $P_i$  des fréquences pour une séquence donnée de quatre acides aminés est supérieur à la probabilité minimale ( $P_i$  min) de structuration selon le coude considéré, la formation d'un tel coude à cet endroit est alors fortement probable.

TYPE I								
	AA	H	L	A	P	Y	S	D
	<b>f</b>	0,0408	0,0190	0,0210	0,0001			
			0,0117	0,0296	0,0047	0,0289		
				0,0136	0,0721	0,0202	0,0211	
					0,0279	0,0145	0,0421	0,0289
	<b>P<sub>i</sub></b>							
HLAP	1,63E-09							
LAPY	4,70E-08							
APYS	4,18E-07							
PYSD	4,92E-07							
								Pi min : 5,46E-7
TYPE II								
	AA	H	L	A	P	Y	S	D
	<b>f</b>	0,0041	0,0029	0,0012	0,0001			
			0,0146	0,0136	0,0001	0,0173		
				0,0148	0,0581	0,0058	0,0074	
					0,0186	0,0087	0,0025	0,0163
	<b>P<sub>i</sub></b>							
HLAP	1,43E-12							
LAPY	3,44E-10							
APYS	3,69E-08							
PYSD	6,59E-09							
								Pi min : 1,13E-8
Non Spécifique								
	AA	H	L	A	P	Y	S	D
	<b>f</b>	0,0367	0,019	0,0148	0,0558			
			0,0292	0,0346	0,0535	0,0462		
				0,0187	0,0605	0,026	0,057	
					0,0465	0,289	0,0483	0,0271
	<b>P<sub>i</sub></b>							
HLAP	5,76E-07							
LAPY	2,50E-06							
APYS	1,68E-06							
PYSD	1,76E-05							
								Pi min : 1,45E-6

En conclusion de ces analyses prédictives de structure secondaire portant sur la séquence 145-183 de l'apoA-I, on peut raisonnablement émettre les hypothèses suivantes :

- La séquence 145-183 de l'apolipoprotéine A-I se compose vraisemblablement de deux régions  $\alpha$ -hélicoïdales (145-163) et (168-183).
- Ces deux  $\alpha$ -hélices présentent un potentiel amphipathique important.
- Les deux hélices sont séparées par un court segment de quelques acides aminés, différemment structuré. Il est difficile de tirer une conclusion quant à la structure exacte de ce segment, qui pourrait constituer soit un coude  $\beta$  (de type 2 ou de type indéterminé), soit une structure en pelote statistique, ou encore toute forme intermédiaire. Néanmoins, quelque soit sa structure, ce segment constitue une rupture nette entre les 2 segments hélicoïdaux.

## 2.2. Modélisation moléculaire

L'analyse conformationnelle des structures chimiques permet de déterminer les structures les plus probables pour une molécule dans un solvant donné. Le programme Prot<sup>+</sup>/Tammo<sup>132</sup>, conçu par Robert Basseur de l'Université Agronomique de Gembloux (Belgique), fonctionne en intégrant quatre étapes successives :

### • La paramétrisation moléculaire.

Il s'agit des paramètres structuraux et énergétiques qui définissent une structure moléculaire comme la connectivité atomique, les longueurs de liaisons, les angles de valence, les angles de torsion et la densité électronique.

### • La recherche des structures les plus probables

C'est une analyse systématique qui a pour but, à partir d'une structure étendue, de rechercher les structures les plus probables, par rotation des angles de torsion

### • L'optimisation des structures les plus probables et l'analyse statistique des structures minimisées.

L'énergie des structures précédemment définies est minimisée.

### • Le calcul et le tracé des potentiels moléculaires d'hydrophobicité (MHP).

Cette fonction permet d'accéder à une représentation tridimensionnelle de la molécule qui inclue le tracé des potentiels électrostatiques ou d'hydrophobicité sous la forme de courbes isopotentielle autour de la molécule modélisée.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la modélisation du segment 145-183 de l'apoA-I humaine et, compte tenu des résultats des méthodes prédictives précédemment présentées, les contraintes suivantes ont été imposées à la molécule de départ :

- Séquence 145-163 structurée en  $\alpha$ -hélice.
- Séquence 169-183 structurée en  $\alpha$ -hélice.
- Séquence 164-168 non structurée

A l'issue de cette paramétrisation, les angles de torsions ( $\psi$  et  $\phi$ ) des acides aminés de la zone d'articulation (164-168) qui sépare les hélices ont été identifiés et le programme leur a donné successivement les valeurs  $0^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $120^\circ$ ,  $180^\circ$ , etc.(méthode stéréoalphabet). Le programme a ensuite minimisé et analysé les structures les plus probables par la méthode Simplex<sup>245</sup>. La solution présentée sur la **figure 5** est la structure que nous avons choisie parmi les 10 solutions d'énergie minimale. Les autres solutions présentaient, soit des hélices cassées à un ou plusieurs endroits, soit des motifs hélicoïdaux ne se situant pas dans un même plan.

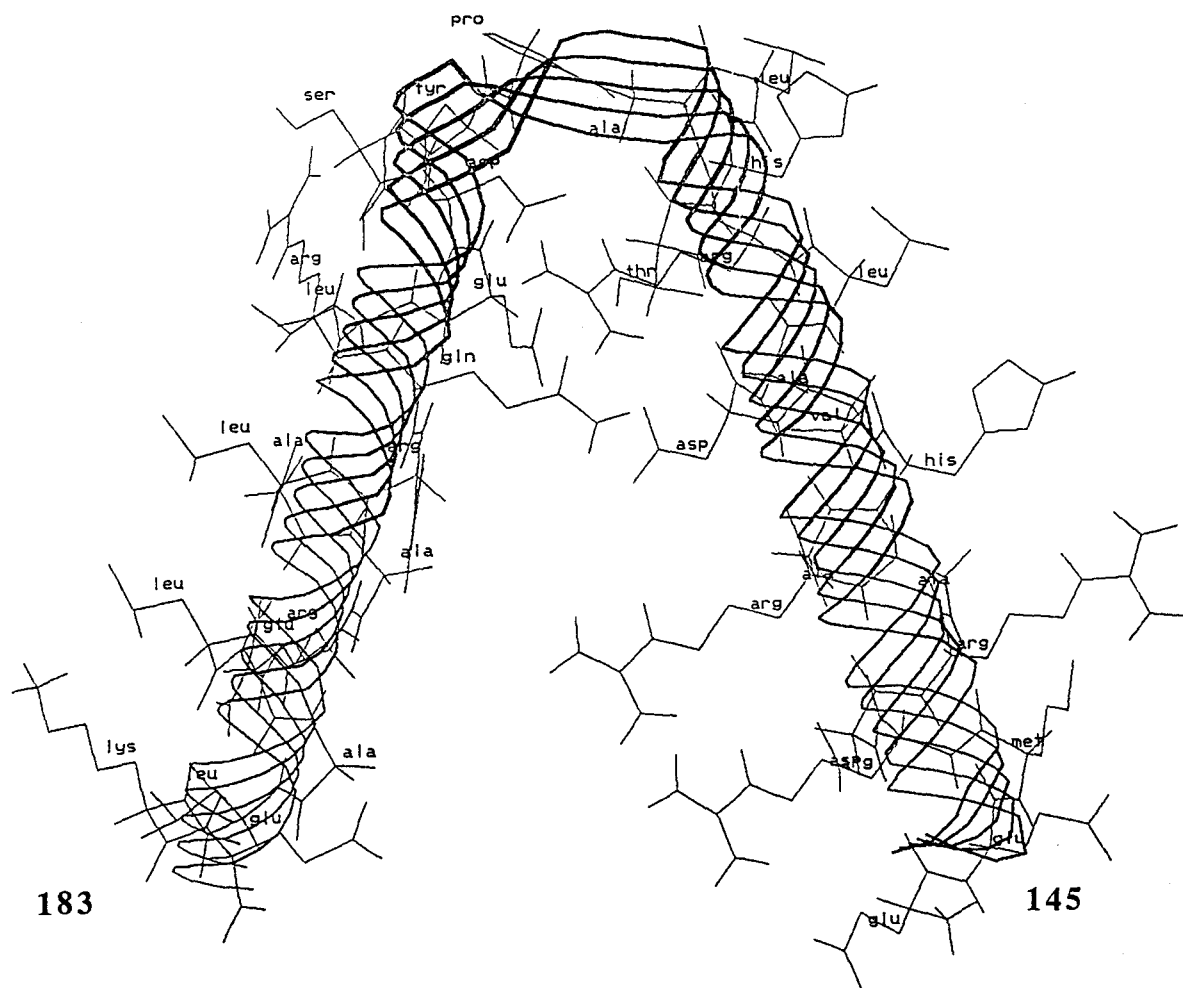


Figure 5. Modélisation du peptide apoA-I [145-183] par le programme Prot<sup>+</sup> développé par R. Brasseur<sup>132</sup>.



**Tableau 2. Résultats de la modélisation de la structure du peptide apoA-I [145-183] à l'aide du programme prot<sup>+</sup>132.**

<b>Prédiction des interactions électrostatiques</b>	<b>distance en nm</b>
Arg <sub>149</sub> - Glu <sub>183</sub>	0,80
Arg <sub>153</sub> - Glu <sub>183</sub>	0,86
Arg <sub>153</sub> - Glu <sub>179</sub>	0,91
Arg <sub>173</sub> - Asp <sub>157</sub>	0,43
Arg <sub>160</sub> - Asp <sub>168</sub>	0,20
<b>Calcul des différentes énergies d'interaction entre hélices (KJ)</b>	
Forces de van der Waals	-51,5 kJ
Energie d'interaction hydrophobe	60,6 kJ
Energie d'interaction électrostatique	-563,2 kJ
Energie totale	-554,1 kJ
<b>Autres données</b>	
Estimation de l'angle formé par les axes des hélices	20°
Distance entre les extrémités N et C-terminales	2 nm

Le programme permet également d'accéder aux informations suivantes : identification des couples de résidus susceptibles d'établir des interactions électrostatiques ( $d < 1$  nm), détermination de la distance entre extrémités C-terminale et N-terminale, estimation de la valeur de l'angle que forment les axes longitudinaux des deux hélices, calcul des énergies d'interactions inter-hélices (Van der Waals, hydrophobes, électrostatiques, et totales). Ces diverses informations sont récapitulées dans le **tableau 2**. La modélisation du fragment 145-183 de l'apoA-I par le programme Prot<sup>+</sup> suggère que la zone d'articulation 164-168 est suffisamment longue pour permettre aux deux hélices de s'orienter de façon antiparallèle l'une par rapport à l'autre. Selon ce modèle, cette région ne possède pas une véritable structure en coude  $\beta$  qui devrait, en plus de l'inversion de l'orientation de la chaîne peptidique, permettre l'établissement d'une liaison hydrogène entre le résidu  $i$  et  $i+3$  du coude. Or, sur le modèle, l'établissement d'une telle liaison entre les 2 résidus (respectivement alanine et tyrosine) apparaît peu probable ( $d > 0,7$  nm). La structure de la région 164-168 s'apparenterait plutôt à celle d'un brin  $\beta$  étendu.

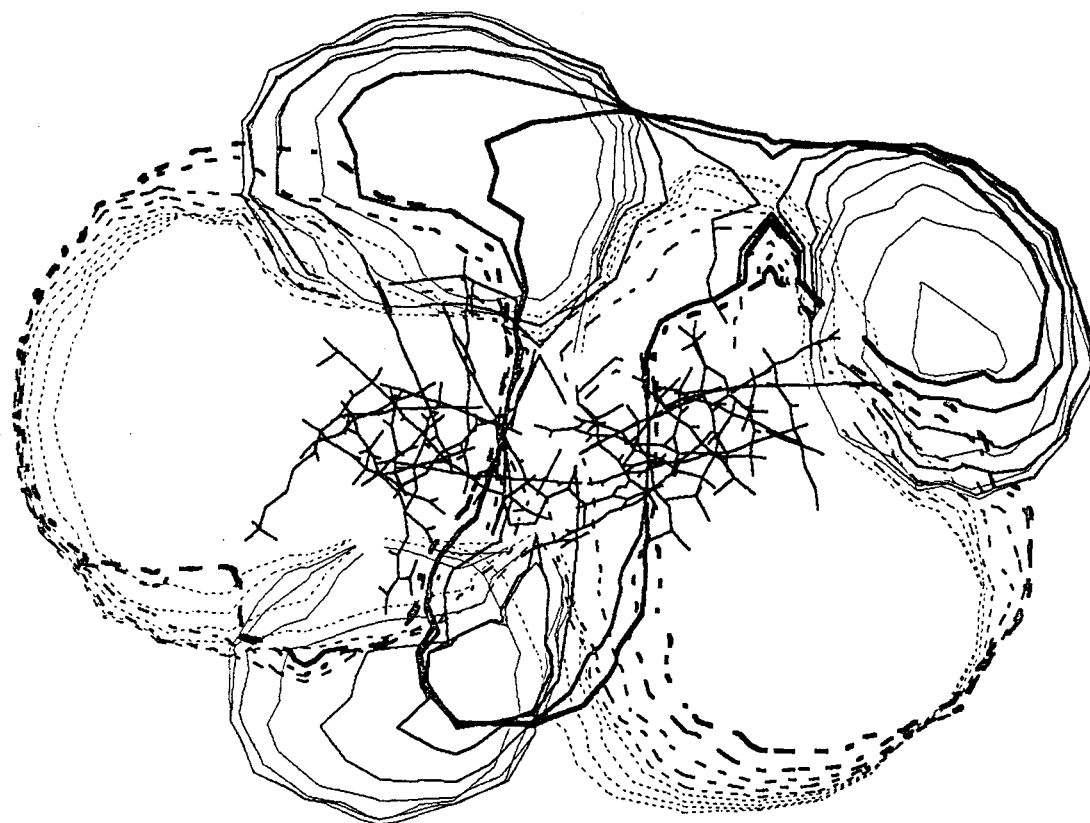
Ce modèle met en évidence, d'autre part, que la formation d'interactions électrostatiques entre certains résidus chargés des 2 hélices adjacentes peut être envisagée. La valeur de l'énergie d'interaction électrostatique entre les deux hélices suggère que ces ponts salins interviennent de façon importante au niveau de la stabilisation du motif hélice-brin  $\beta$ -hélice.

Robert Brasseur<sup>134</sup> a récemment introduit le concept de potentiel moléculaire d'hydrophobicité (MHP) afin de proposer une classification des hélices amphipathiques aptes à interagir avec les lipides. Le calcul de ce paramètre pour une ou plusieurs hélices permet de visualiser des enveloppes hydrophobes et hydrophiles s'organisant autour d'une représentation tridimensionnelle de la molécule modélisée. Par analogie avec le concept du potentiel moléculaire lipophile (MLP) introduit par Furet et coll.<sup>246</sup>, Brasseur propose que l'interaction hydrophobe entre un point M de l'espace et un atome i décroît de façon exponentielle avec la distance les séparant. Ce postulat implique l'équation (1) de calcul des MHP où  $E_{tri}$  représente l'énergie de transfert de l'atome i, c'est à dire l'énergie qu'il faut fournir à l'atome i pour permettre son passage d'une phase hydrophobe vers une phase hydrophile,  $r_i$  son rayon, et  $d_i$  la distance entre l'atome i et le point M. Les valeurs de  $E_{tri}$  utilisées dans le programme Tammo sont celles compilées par Tanfort<sup>160</sup>.

$$MHP = \sum E_{tri} \cdot e^{-(r_i - d_i)} \quad (1)$$

Afin de calculer les MHP pour le motif hélicoïdal considéré, un plan perpendiculaire à l'axe longitudinal de l'hélice est déplacé tous les 0,2 nm le long de l'hélice. Les MHP sont ainsi calculés en utilisant l'équation 2 pour chaque point contenu dans le plan. Une variante d'un programme préexistant<sup>247</sup>, permettant de visualiser des lignes isopotentielles électroniques, conduit à une représentation tridimensionnelle des MHP le long de l'axe de l'hélice. Une telle représentation peut être visualisée sur la **figure 6**.

La dichotomie polaire/apolaire, mise en évidence par le calcul des MHP, confirme le potentiel amphipathique du fragment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I et rend compte du potentiel de cette séquence à s'associer avec les phospholipides. De plus, si on considère chaque hélice individuellement, la dichotomie polaire/apolaire n'est pas distribuée de manière symétrique, conformément au modèle de l'hélice amphipathique de classe A proposé par Segrest<sup>120</sup>. La modélisation du segment 145-183 montre qu'un rééquilibre de la proportion polaire/apolaire s'opère lorsque l'on considère, non pas une hélice individuelle, mais un couple d'hélices. En effet, les hélices interagissant entre elles par une partie de leur face polaire, la proportion de résidus apolaires présentés en périphérie d'une paire d'hélice augmente sensiblement par rapport à la proportion observée dans une seule hélice.



**Figure 6. Visualisation de l'amphipathicité du peptide apoA-I [145-183] par la technique des MHP mise en œuvre par le programme Tammo<sup>134</sup>.**  
Pointillés : potentiel hydrophile.  
Lignes pleines : potentiel hydrophobe.

En conclusion de cette étude de prédiction structurale et de cette modélisation, il est possible d'avancer les éléments suivants concernant la structure tertiaire du fragment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I humaine :

- Les résidus appartenant aux séquences 145-163 et 168-183 de l'apoA-I semblent engagés dans une structure de type hélice  $\alpha$ .

- Les résidus compris entre les positions 164 et 167 sont inclus soit dans un coude  $\beta$  (de type 2 ou de type indéterminé), soit dans une conformation plus étendue de type brin  $\beta$ . Ce segment permet une inversion de la chaîne peptidique conduisant vraisemblablement à un positionnement quasiment antiparallèle des deux hélices qui forment toutefois un angle de l'ordre de  $20^\circ$ .

- La modélisation moléculaire des MHP, associée à la représentation de "Schiffer-Edmunson", montre l'amphipaticité du système étudié et rend compte d'un potentiel d'association important de la séquence 145-183 de l'apoA-I vis-à-vis des lipides.

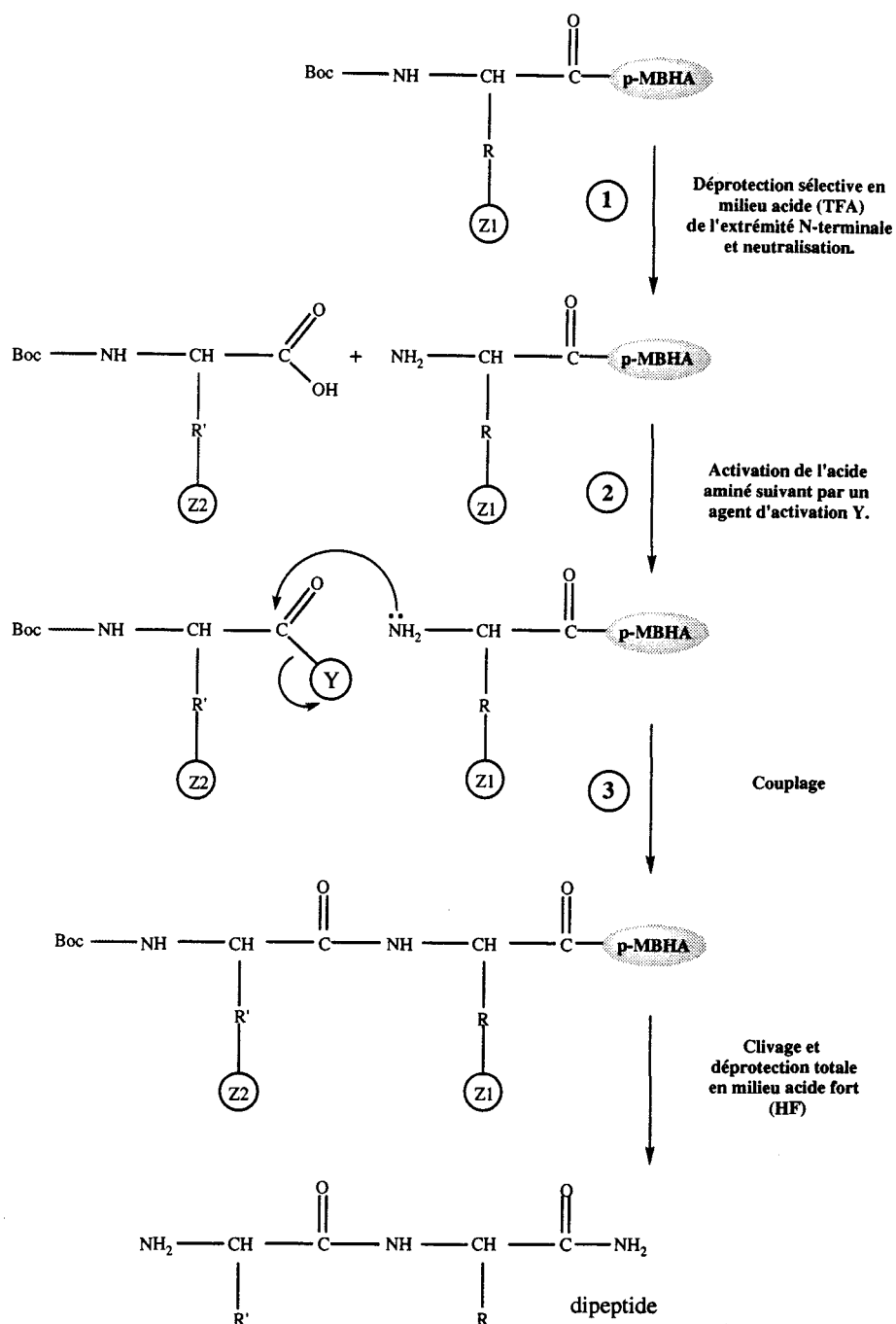
- Enfin, le calcul de la composante électrostatique de l'énergie d'interaction qui s'exerce entre les deux hélices, montre que celle-ci est largement majoritaire par rapport aux autres forces mises en jeu. La stabilité du motif considéré peut donc dépendre de ponts salins s'établissant entre les 2 hélices par l'intermédiaire de certains résidus de charges opposées. De même, la faible composante hydrophobe de cette énergie suggère que l'interaction entre les hélices ne fait appel qu'à des résidus polaires permettant ainsi un lissage de la proportion polaire/apolaire à la périphérie de la molécule.

La modélisation moléculaire met en évidence un potentiel de liaison aux lipides important du fragment 145-183 de l'apoA-I. Afin de vérifier expérimentalement ces prédictions, les peptides correspondant aux segments 145-183, 161-183 et 166-183 ont été synthétisés en phase solide.

### **3. SYNTHÈSE DES PEPTIDES**

#### **3.1. Synthèse automatisée en phase solide**

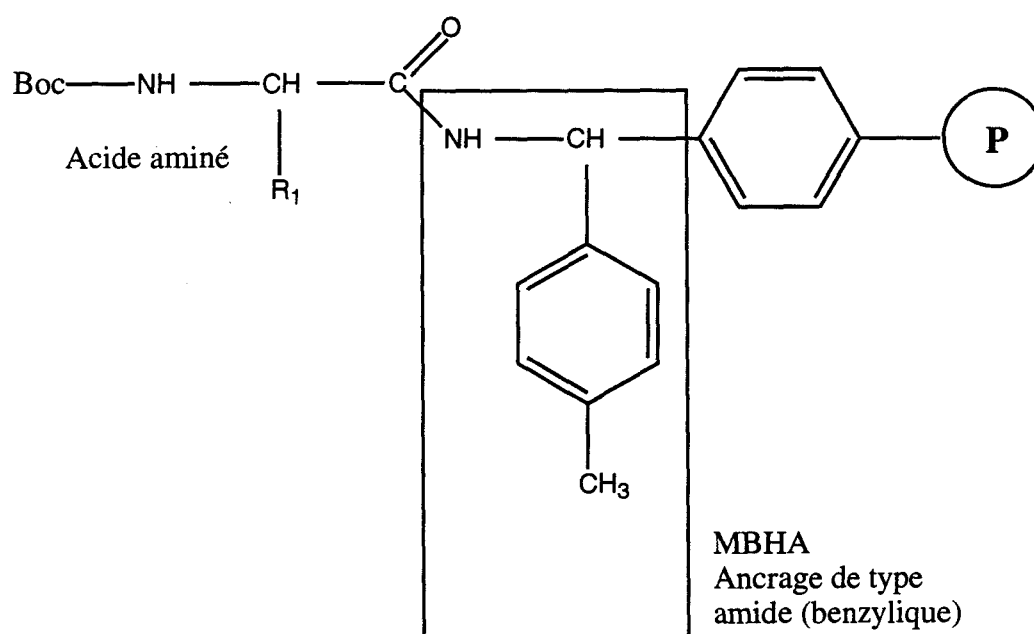
Le concept de la synthèse peptidique en phase solide introduit par Merrifield<sup>248</sup> est basé sur l'addition récurrente d'acides aminés sur un support insoluble. La présence de ce support entraîne un gain de temps et une simplification des protocoles car les réactifs et les divers solvants de lavage peuvent être éliminés au moyen d'une simple filtration sur verre fritté. Les acides aminés sont protégés de manière temporaire au niveau de leur fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, d'une part, et de manière permanente au niveau de leur chaîne latérale, d'autre part (au moyen d'une protection orthogonale par rapport à la précédente). Le premier acide aminé est lié de façon covalente au support solide à l'aide d'un agent de couplage. La déprotection sélective de la fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la chaîne peptidique en cours d'élongation permet ensuite le couplage de l'acide aminé suivant. Ces cycles de déprotection et de couplage sont répétés n fois jusqu'à l'obtention du peptide désiré. En fin de synthèse, le peptide est obtenu par clivage de son support insoluble et des protections des chaînes latérales des résidus sensibles.



**Figure 7. Synthèse peptidique en phase solide : stratégie t-Boc/benzyle sur support MBHA, appliquée à la synthèse d'un dipeptide.**

La synthèse s'effectue en sens inverse de la biosynthèse et l'incorporation de chaque acide aminé correspond à 1 cycle de couplage. Chaque cycle se décompose en 3 grandes étapes : ① déprotection sélective du groupement temporaire t-Boc, ② activation de l'acide aminé à coupler, ③ couplage de l'acide aminé activé. Les étapes ①, ②, et ③ sont renouvelées pour le couplage d'un autre acide aminé. A la fin de la synthèse, les groupements protecteurs des chaînes latérales sensibles sont clivés ainsi que l'ancrage au support insoluble.

Les peptides correspondant aux séquences 166-183, 161-183, et 145-183 (**figure 1**) de l'apolipoprotéine A-I humaine ont été synthétisés sur un automate Applied Biosystems 430A (Foster City, CA). Ce type de synthétiseur est programmé afin d'appliquer la stratégie de synthèse peptidique en phase solide mise au point par Merrifield. Un schéma global décrivant le principe de ce type de synthèse est représenté sur la **figure 7**. Le support solide de la synthèse est une résine en polystyrène possédant un ancrage de type 4-méthyl benzhydrylamine (MBHA) (**figure 8**). Elle est commercialisée par Applied Biosystems (Foster City, CA) et sa charge initiale est de 0,77 meq de fonctions  $\text{NH}_2$  par gramme de résine.



**Figure 8. Un support insoluble utilisé en synthèse peptidique en phase solide: la 4-méthyl benzhydrylamine résine (MBHA).**

P : matrice de polystyrène réticulée à 1% par du divinylbenzène.

La procédure de couplage chimique utilisée mettait en jeu le 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate<sup>249</sup> (HBTU) et le 1-hydroxy-benzotriazole (HOBT) associés à une stratégie de protection t-Boc/Benzyl. Les groupements protecteurs des chaînes latérales sensibles étaient les suivants :

- Asp(O-cyclohexyl)
- Glu(O-cyclohexyl)
- His(N<sup>im</sup>-2,4-dinitrophenyl)
- Lys(Nε-2-chloro-benzyloxycarbonyl)
- Met(sulfoxyde)
- Arg(NG-tosyl)
- Ser(O-benzyl)
- Thr(O-benzyl)
- Tyr(O-2-bromobenzyloxycarbonyl)

Chaque acide aminé a été successivement mis en contact avec la peptidyl-résine dans la N-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP) pendant 30 min sous agitation en utilisant la stoechiométrie suivante par rapport aux fonctions  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> réactives :

- acide aminé 2 équivalents
- HBTU 2 équivalents
- HOBT 2 équivalents
- diisopropyléthylamine (DIEA) 6 équivalents

Afin d'améliorer la solvataion de la peptidyl-résine dans le mélange réactionnel, du dimethylsulfoxyde (DMSO) a été ajouté en fin de couplage pour une durée de 5 min de couplage supplémentaire (concentration finale de DMSO : 15% en volume). D'autre part, dans le but d'optimiser le rendement de synthèse, chaque couplage d'acide aminé a systématiquement été doublé.

Après le lavage de la résine par de la NMP puis du dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), les fonctions  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> n'ayant pas réagi ont été bloquées par acétylation afin d'éviter la formation de peptides délétés trop difficiles à séparer du peptide final attendu par HPLC (propriétés physico-chimiques trop proches). Cette opération, nommée *capping*, a été réalisée de la façon suivante :

- DIEA 5% (en volume) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 4 min.
- 3 lavages au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- anhydride acétique 10% (en volume) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 8 min.
- 4 lavages au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Si l'acide aminé s'est couplé correctement, il présentera une extrémité N-terminale protégée qui ne subira pas l'action de l'anhydride acétique. En revanche, les peptides délétés présenteront à leur extrémité N-terminale la fonction aminée libre de l'acide aminé précédent et seront donc acétylés. Les peptides tronqués obtenus par *capping* seront d'autant plus faciles à purifier que la troncature adviendra tôt au cours de la synthèse. En effet, plus la longueur des peptides tronqués sera faible, plus ces peptides auront des propriétés physico-chimiques différentes du peptide attendu.

Après chaque étape de *capping*, le groupement t-Boc protégeant la fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminale du peptide en cours de synthèse a été clivé dans les conditions suivantes :

- acide trifluoroacétique (TFA) 50% (en volume) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 16 min
- Neutralisation par la DIEA 5% (en volume) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 4 min

Après cette étape, la peptidyl-résine présentait à nouveau une fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libre susceptible de réagir avec un acide aminé protégé activé. Lorsque tous les acides aminés ont été couplés, la fonction NH<sub>2</sub>-terminale a été déprotégée de son groupement t-Boc et acétylée suivant

une procédure de *capping* classique afin que tous les peptides présentent une extrémité N-terminale bloquée.

A ce stade, il a été possible de déterminer le rendement de synthèse en masse ( $R_s$ ) sur phase solide comme suit :

$$R_s (\%) = \frac{(M_f - M_i)}{(M_{tf} - M_i)} \times 100$$

où  $M_f$  représente la masse finale de résine obtenue après synthèse,  $M_i$  la masse initiale de résine introduite dans le réacteur, et  $M_{tf}$  la masse théorique attendue en supposant un couplage quantitatif de chaque acide aminé. Pour les trois peptides, les rendements de synthèse en masse étaient les suivants :

ApoA-I [166-183] :  $R_s = 90,8\%$  ( $M_i = 0,650$  g;  $M_f = 2,50$  g;  $M_{tf} = 2,688$  g)

ApoA-I [161-183] :  $R_s = 87,6\%$  ( $M_i = 0,325$  g;  $M_f = 1,37$  g;  $M_{tf} = 1,516$  g)

ApoA-I [145-183] :  $R_s = 81,7\%$  ( $M_i = 0,325$  g;  $M_f = 1,92$  g;  $M_{tf} = 2,281$  g)

### 3.2. Clivage de la résine et déprotection des peptides

La peptidyl-résine a ensuite subi une thiololyse permettant d'éliminer le groupement protecteur  $N^{im}$ -2,4-dinitrophenyl des 2 résidus d'histidine en position 155 et 162. Ce groupement protecteur est, en effet, résistant à l'acide fluorhydrique qui permet de déprotéger toutes les autres chaînes latérales des peptides synthétisés au cours de cette étude. La déprotection de l'histidine s'effectue donc en phase solide dans les conditions suivantes :

- 2-mercaptoéthanol 20% (en volume), DIEA 5% (en volume) dans la NMP, 2 heures.
- 4 lavages à la NMP.

Chaque peptide a ensuite été désolidarisé de son support insoluble par action de l'acide fluorhydrique anhydre. L'ancrage de type MBHA est, en effet, labile en milieu acide très fort. Son clivage libère une fonction C-terminale bloquée sous forme carboxamide. Le blocage des extrémités N- et C-terminales a un but particulier. En effet, de nombreux travaux soulignent qu'il permet d'augmenter le repliement des peptides potentiellement hélicoïdaux<sup>250.251</sup>.

Ainsi qu'indiqué plus haut, la coupure par l'acide fluorhydrique permet également le clivage des protections permanentes des chaînes latérales du peptide. Ces déprotections génèrent un grand nombre de carbocations qu'il faut piéger dans le milieu de coupure afin d'éviter qu'ils



ne réagissent avec certaines fonctions du peptide. Dans ce but, des molécules pièges, appelées *scavengers* (para-crésol, para-thiocrésol), capables de capter ces carbocations, sont ajoutées dans le milieu de coupure. Par ailleurs, la présence d'une méthionine en position 148, susceptible de s'oxyder pendant l'étape de coupure à haute concentration en acide fluorhydrique, rend nécessaire l'utilisation d'un protocole particulier<sup>252</sup> pour le peptide apoA-I [145-183].

- peptides apoA-I [166-183] et [161-183] :

clivage à haute concentration en HF (*High HF*) par un mécanisme de type S<sub>N</sub>1, en présence de molécules *scavengers*.

- peptide [145-183] :

1- réduction de la méthionine sulfoxyde en méthionine par un mécanisme S<sub>N</sub>2, en présence d'HF dilué dans le diméthylsulfure (*Low HF*) et de molécules *scavengers*.

2- clivage à haute concentration en HF (*High HF*) par un mécanisme de type S<sub>N</sub>1, en présence de molécules *scavengers*.

#### *Low HF*

Dans un réacteur en Téflon maintenu à 0°C, la peptidyl-résine est agitée en présence d'un mélange HF/diméthylsulfure/p-crésol (25 :65 :10, en volume) pendant 150 min, sous vide. L'HF et le diméthylsulfure sont ensuite évaporés sous vide et la peptidyl-résine est lavée plusieurs fois à l'éther éthylique avant d'être remise dans le réacteur en Téflon pour y subir la coupure à haute concentration en HF (*High HF*).

#### *High HF*

Dans un réacteur en Téflon maintenu à 0°C, la peptidyl-résine est agitée en présence d'un mélange HF/ p-crésol (90 :10, en volume) pendant 90 min, sous vide. L'HF est ensuite évaporé sous vide et le mélange résine/peptide est lavé plusieurs fois à l'éther éthylique.

### **3.3. Elimination des *scavengers* et solubilisation du peptide**

L'élimination des *scavengers* est réalisée suivant une procédure appelée TFA/éther comprenant quatre étapes successives :

- solubilisation du peptide et des *scavengers* dans le TFA
- filtration de la suspension pour éliminer la résine
- précipitation du peptide dans l'éther éthylique (les *scavengers* restant y sont solubles)
- récupération du peptide par centrifugation

Concrètement, le mélange résine/peptide est mis en contact avec 3 ml de TFA. Un passage sur verre fritté de ce mélange permet de séparer de la résine le mélange peptide/*scavengers* en solution dans le TFA. Le filtrat est versé goutte à goutte dans de l'éther éthylique (300 ml) dans lequel le peptide, insoluble, précipite tandis que la plupart des *scavengers* passent en solution. Le peptide est ensuite récupéré par centrifugation et lavé 2 fois à l'éther éthylique. Le culot est enfin séché à l'azote et repris dans l'acide acétique à 10% dans l'eau (en volume). Finalement, le peptide est lyophilisé. A ce stade, on peut déterminer un rendement de clivage correspondant au rapport de la masse théorique de peptide accroché sur la résine par la masse de peptide effectivement récupéré. Ce rendement  $R_c$  est sans doute un peu surestimé car on élimine pas complètement toutes les molécules de *scavengers* par la procédure TFA/éther et par la lyophilisation. Ces rendements, pour les 3 peptides, ont été les suivants :

ApoA-I [166-183] :  $R_c = 87,2\%$

ApoA-I [161-183] :  $R_c = 95,1\%$

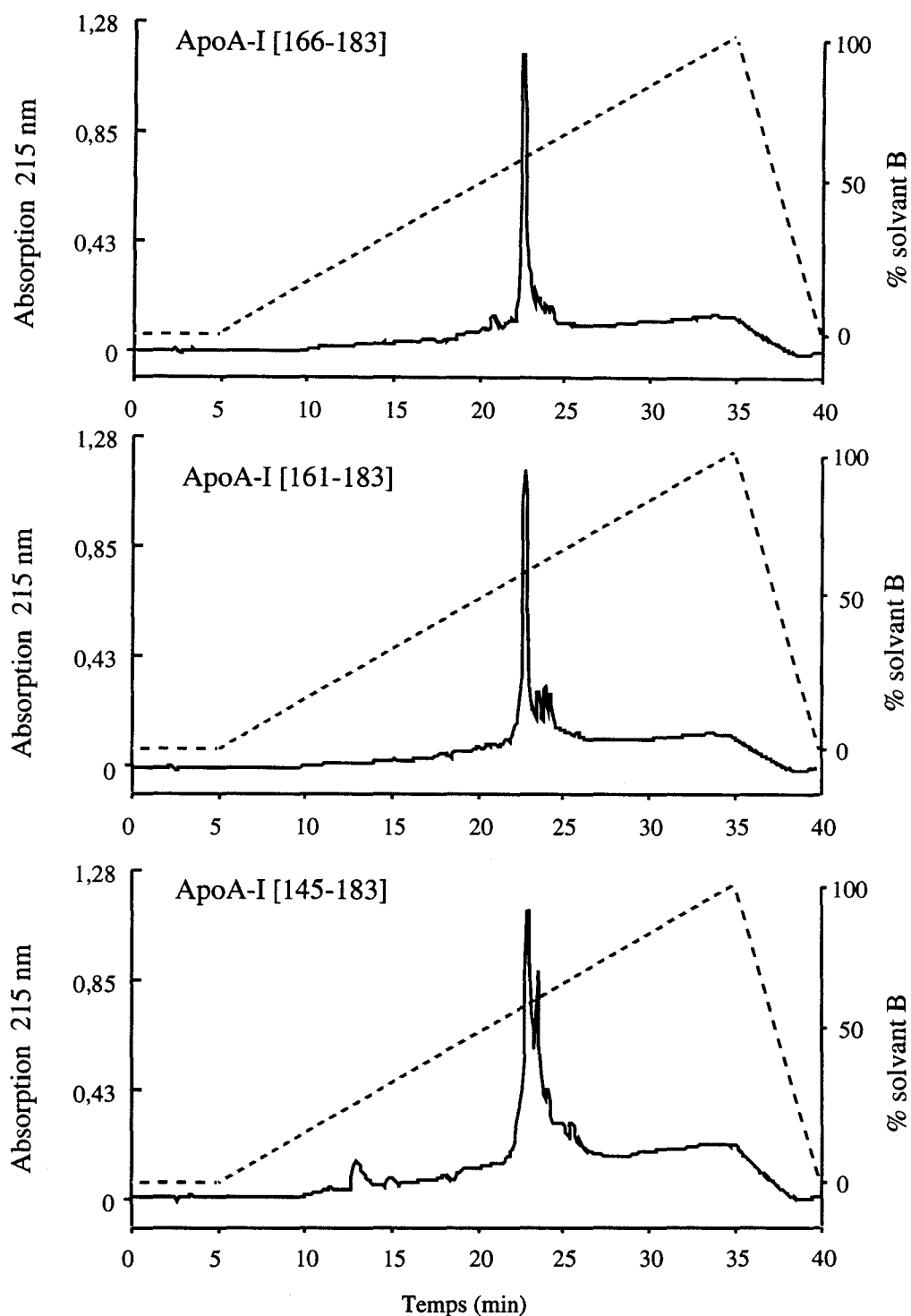
ApoA-I [145-183] :  $R_c = 89,5\%$

#### 4. PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PEPTIDES

##### 4.1. Analyse des produits bruts de coupure HF

Un peptide provenant directement de la procédure TFA/éther sans aucune purification ultérieure est appelé produit brut de coupure HF. L'analyse par RP-HPLC (chromatographie liquide haute performance en phase inverse) du produit brut de coupure HF permet souvent d'évaluer le bon déroulement de la synthèse. En effet, la présence d'un pic majoritaire rend compte de la présence d'un seul produit de synthèse avec peu de sous-produits. En revanche l'existence de plusieurs pics d'aires comparables peut parfois s'expliquer par la présence d'un ou plusieurs sous produit de *capping*, différents du produit attendu. Toutefois, les propriétés physiques différentes des fragments acétylés (en particulier lorsque le *capping* intervient en début de synthèse) entraîne souvent une élution avec un temps de rétention suffisamment différent en RP-HPLC pour permettre une bonne séparation de ces sous-produits.

La **figure 9** présente les analyses en RP-HPLC des produits bruts de coupure HF des peptides apoA-I [166-183], apoA-I [161-183], et apoA-I [145-183].



**Figure 9. Profils RP-HPLC des bruts de coupure HF des peptides apoA-I [161-183], [166-183] et [145-183].**

Colonne (1 x 200 mm) avec silice greffée C<sub>18</sub>, 9 nm de porosité pour 10 µm de diamètre (Vydac Hesperia, CA, USA), gradient linéaire de 0 à 100% de solvant B en 30 min, débit 1 ml/min, système éluant : solvant A. TFA 0,05% dans H<sub>2</sub>O (en volume); solvant B. TFA 0,05%, CH<sub>3</sub>CN 60% dans H<sub>2</sub>O (en volume).

#### 4.2. Purification des peptides

Les produits bruts de coupure HF ont ensuite été purifiés en RP-HPLC sur colonne préparative (10,7 x 500 mm) contenant une silice greffée C<sub>18</sub> de 5 µm de diamètre et de porosité 10 nm (Vydac Hesperia, CA, USA). La quantité maximale de produit brut de coupure HF appliquée sur la colonne était 100 mg et le débit utilisé était 2 ml/min. Un gradient de 0 à 100% en tampon B (TFA 0,05%, CH<sub>3</sub>CN 60% dans H<sub>2</sub>O, en volume) a été appliqué en 120 minutes et la détection réalisée à 230 nm. Les fractions de 1 ml recueillies en sortie de colonne ont ensuite été analysées en RP-HPLC analytique sur colonne C<sub>18</sub> (voir paragraphe précédent) pour contrôler leur homogénéité. Les fractions co-éluantes ont été rassemblées.

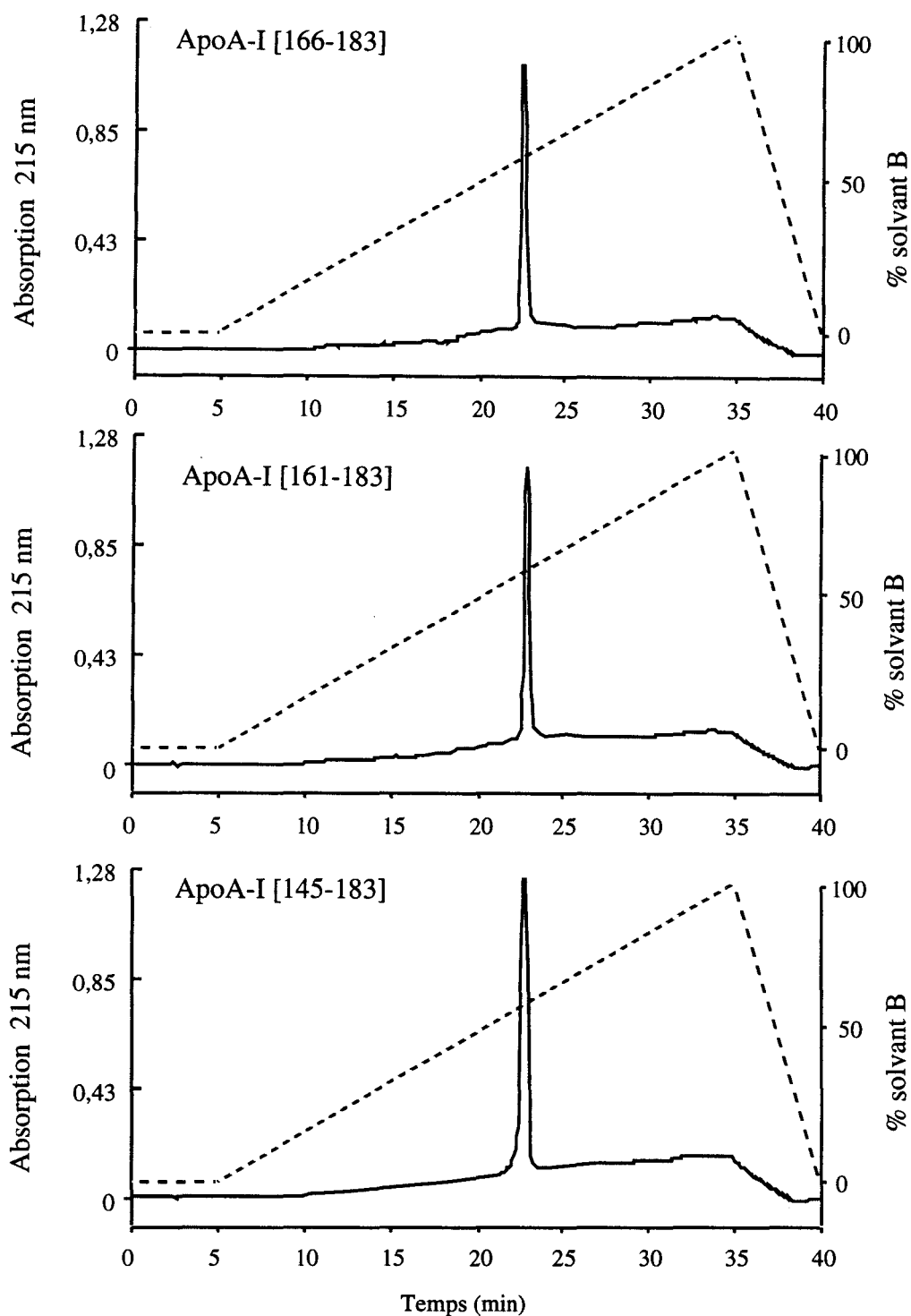
#### 4.3. Caractérisation des peptides

Les profils d'HPLC des 3 peptides, après purification, sont représentés sur la **figure 10**. Un pic unique très étroit a été obtenu pour chacun des trois peptides, suggérant une bonne homogénéité des fractions rassemblées. Cependant, afin de s'assurer de la pureté des peptides ainsi purifiés, nous avons jugé nécessaire d'utiliser un système orthogonal de contrôle de l'homogénéité. En effet, un sous-produit ou une impureté pourrait co-éluer avec le peptide en chromatographie de phase inversée (C<sub>18</sub>). Nous avons utilisé l'électrophorèse capillaire comme technique d'analyse orthogonale. Il s'agit d'une technique analytique rapide et performante. Elle sépare les molécules en fonction de leur charge dans un capillaire en silice contenant un tampon. Cette technique présente l'avantage de permettre une détection en ligne et une introduction automatique des échantillons. L'appareillage utilisé était un système Applied Biosystems model 270 A (Foster city, CA) possédant les caractéristiques suivantes : 25 kV de tension appliquée, capillaire en silice de 50 cm de longueur et de 50 µm de diamètre. La séparation s'est effectuée à 30°C dans un tampon citrate de sodium 20 mM à pH 2,5. La détection a été réalisée à 200 nm. Les profils électrophorétiques des 3 peptides sont représentés sur la **figure 11** et démontrent bien l'homogénéité des fractions rassemblées après la purification par RP-HPLC. En outre, l'électrophorèse capillaire peut être utilisée pour quantifier le degré de pureté d'un peptide synthétique. Les pourcentages de pureté des trois peptides après purification en phase inversée sur colonne C18 ont été les suivants :

Peptide apoA-I [166-183] : 96%

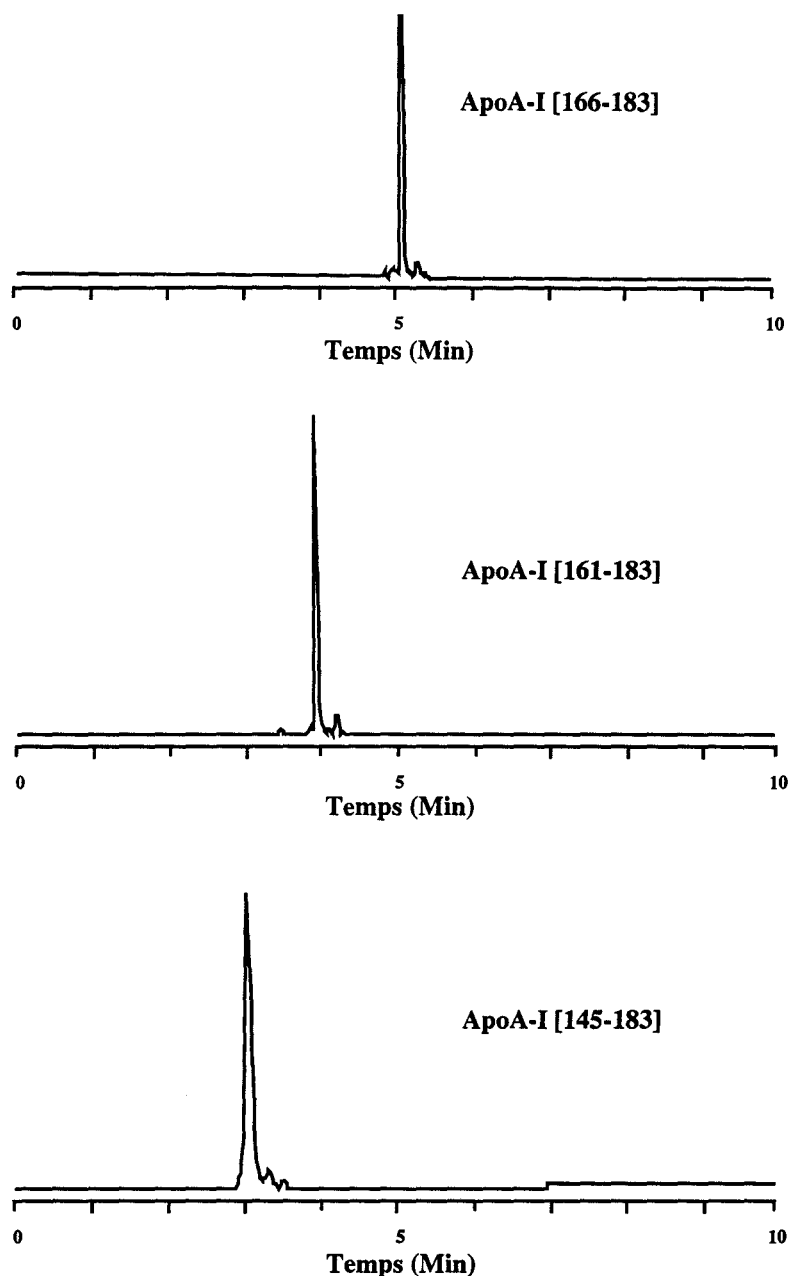
Peptide apoA-I [161-183] : 92,5%

Peptide apoA-I [145-183] : 93%



**Figure 10. Profils RP-HPLC des peptides apoA-I [161-183], [166-183] et [145-183] purifiés sur colonne C<sub>18</sub> préparative.**

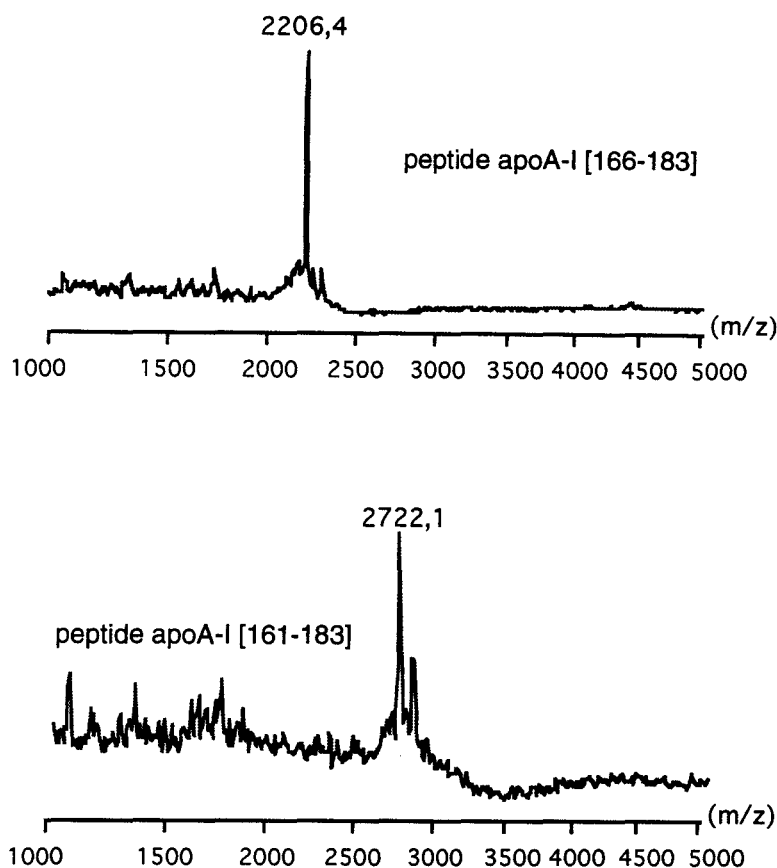
Colonne (1 x 200 mm) avec silice greffée C<sub>18</sub>, 9 nm de porosité pour 10 µm de diamètre (Vydac Hesperia, CA, USA), gradient linéaire de 0 à 100% de solvant B en 30 min, débit 1 ml/min, système éluant : solvant A. TFA 0,05% dans H<sub>2</sub>O (en volume); solvant B. TFA 0,05%, CH<sub>3</sub>CN 60% dans H<sub>2</sub>O (en volume).



**Figure 11. Profils d'électrophorèse capillaire des peptides apoA-I [161-183], [166-183] et [145-183] purifiés sur colonne préparative.** Electrophorèse capillaire Applied Biosystem model 270 A (Foster city, CA), 25 kV de tension appliquée, capillaire en silice de 50 cm de longueur et de 50  $\mu$ m de diamètre. La séparation s'est effectuée à 30°C dans un tampon citrate de sodium 20 mM à pH 2,5. La détection a été réalisée à 200 nm.

Les fractions pures ont ensuite été caractérisées par spectrométrie de masse. Le spectromètre de masse utilisé pour l'analyse des peptides apoA-I [166-183] et [161-183] est un Bio-Ion 20 (Uppsala, Sweden) utilisant le californium comme source de désorption plasmatisque. Son analyseur en temps de vol permet l'enregistrement de spectres avec un voltage

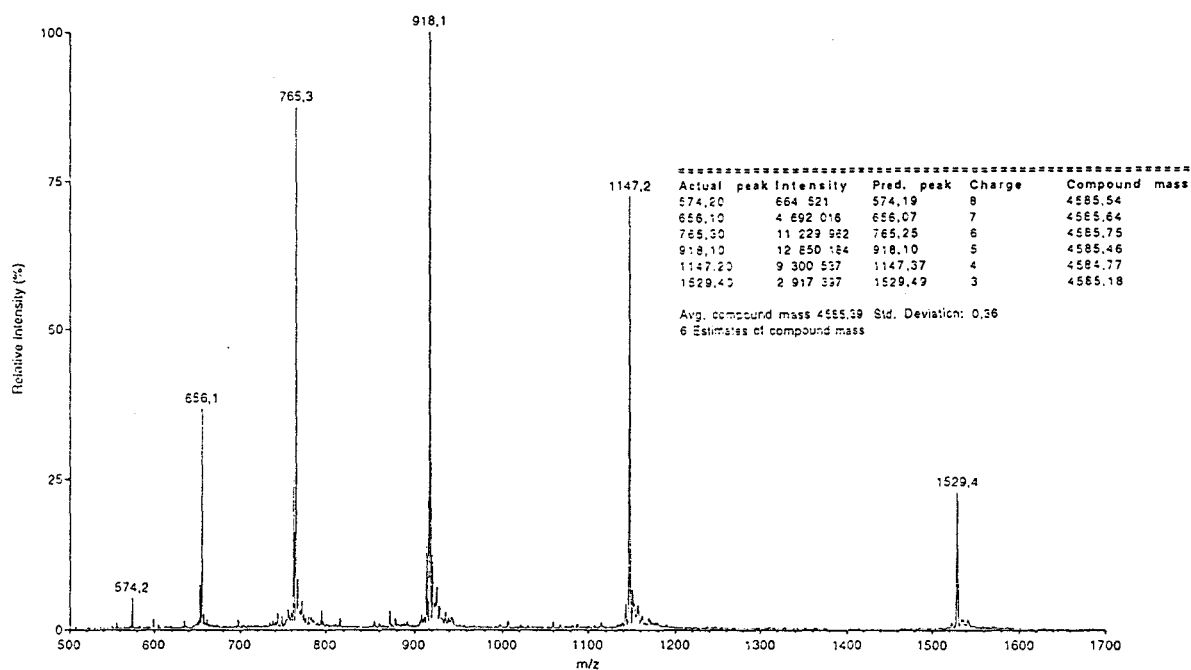
d'accélération de 16 kV. Les spectres de masse correspondant aux deux peptides sont représentés sur la **figure 12a**. Les masses obtenues sont les suivantes : peptide apoA-I [166-183] : 2206,4 Da (masse théorique : 2203 Da), peptide apoA-I [161-183] : 2722,1 Da (masse théorique : 2723 Da), confirmant ainsi l'identité de ces peptides purifiés.



**Figure 12a. Spectres de masse (PD-MS) des peptides [161-183] et [166-183].** Spectromètre Bio-Ion 20 (Uppsala, Sweden) utilisant le californium (Cf) comme source de désorption plasmatisée. Son analyseur en temps de vol permet l'enregistrement de spectres grâce à un voltage d'accélération de 16 kV.

La masse importante du peptide 145-183 (4583,4 Da) ne nous a pas permis d'utiliser le spectromètre de masse en temps de vol. Nous avons donc vérifié l'identité de ce peptide en utilisant une autre technique de spectrométrie de masse : *l'electron-spray*. Le spectromètre ESI-MS API-1 Sciex Perkin-Elmer (Foster City, CA) utilise un champ électrique très fort ( $10^6$  V/m) pour générer, à partir de l'échantillon, des ions multi-chargés. Il bénéficie d'un analyseur quadripolaire en sortie, afin de séparer ces ions et de les identifier. Cet appareil permet l'analyse de masse moléculaire allant jusqu'à 130 kDa. Le spectre présenté sur la **figure 12b** confirme

l'identité du peptide purifié 145-183, avec une masse mesurée de 4585,39 (masse théorique 4583,4 Da).



**Figure 12b. Spectre de masse (ESI-MS) du peptide [145-183].**

Le spectromètre API-1 Sciex Perkin-Elmer (Foster City, CA) utilise un champ électrique très fort ( $10^6$  V/m) pour générer, à partir de l'échantillon, des ions multi-chargés. Ces ions sont ensuite analysés grâce à un analyseur quadripolaire.

Enfin, la détermination de la composition en acides aminés de chaque peptide a été utilisée comme critère supplémentaire d'identification. Pour cela, une hydrolyse acide totale a été effectuée sur chaque peptide dans les conditions opératoires suivantes : 3 mg de peptides ont été mis en contact pendant 24 heures, à  $110^\circ\text{C}$ , sous vide avec 1ml d'HCL 6N et 20  $\mu\text{l}$  de phénol 5%. Après 24 heures, l'hydrolysât est séché sous vide et remis en solution dans un tampon citrate à pH 2. L'échantillon peut alors être analysé en chromatographie d'échange d'ions sur une résine échangeuse de cations à l'aide d'un système haute performance Beckman analyser 6300 (Fullerton, USA). Les résultats obtenus avec les 3 peptides sont résumés sous la forme d'un tableau reprenant les valeurs théoriques et les valeurs mesurées après retraitement de l'analyse (**Tableau 3**). Ce tableau montre une bonne concordance entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques de la composition en acides aminés des trois peptides.



**Tableau 3. Composition en acides aminés théorique et mesurée des trois peptides issus de l'apolipoprotéine A-I humaine : apoA-I [166-183], [161-183] et [145-183].**

L'analyse est réalisée sur un système chromatographique d'échange de cations haute performance *Beckman Analyser 6300* (Fullerton, USA) après hydrolyse acide des peptides par l'HCl 6N en présence de phénol 5%, pendant 24 heures à 110°C. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus.

	apoA-I [166-183]		apoA-I [161- 183]		apoA-I [145-183]	
	Théorique	Mesurée	Théorique	Mesurée	Théorique	Mesurée
Asp	1	0,84	1	0,77	3	3,02
Thr			1	0,56	1	1,01
Ser	1	0,60	1	0,60	1	1,06
Glu/Gln	4	4,00	4	4,00	6	5,86
Pro			1	0,83	1	1,15
Gly					1	1,09
Ala	3	2,92	4	3,64	7	6,71
Val					1	0,95
Met					1	0,55
Leu	4	3,92	5	4,51	6	6,00
Tyr	1	0,86	1	0,67	1	1,02
His			1	0,63	2	1,86
Lys	1	0,93	1	0,94	1	1,62
Arg	3	2,98	3	3,04	7	6,53

Deux critères orthogonaux d'homogénéité (RP-HPLC et électrophorèse capillaire) et deux critères d'identification (spectrométrie de masse et composition en acides aminés) ont donc été utilisés pour caractériser les peptides apoA-I [166-183], [161-183] et [145-183].

A ce stade, on peut calculer pour chaque peptide, le rendement de purification ( $R_p$ ). Celui ci correspond au rapport de la masse de peptide pur obtenue sur la masse de produit brut de coupure HF traité. Pour les trois peptides synthétisés, les rendements ont été les suivants :

ApoA-I [166-183] :  $R_p = 40,4\%$

ApoA-I [161-183] :  $R_p = 29,5\%$

ApoA-I [145-183] :  $R_p = 20,2\%$

Le rendement global de synthèse (R) peut maintenant être déterminé. Il correspond au produit des rendements intermédiaires précédemment calculés :  $R = R_s$  (rendement de synthèse sur résine)  $\times R_c$  (rendement de coupure)  $\times R_p$  (rendement de purification). Pour les trois peptides, les rendements globaux de synthèse obtenus ont été les suivants :

ApoA-I [166-183] : **R = 31,8%**

ApoA-I [161-183] : **R = 24,5%**

ApoA-I [145-183] : **R = 14,8%**

Ces rendements n'ont pas été optimisés.

#### **4.4. Synthèse et purification des peptides dansylés**

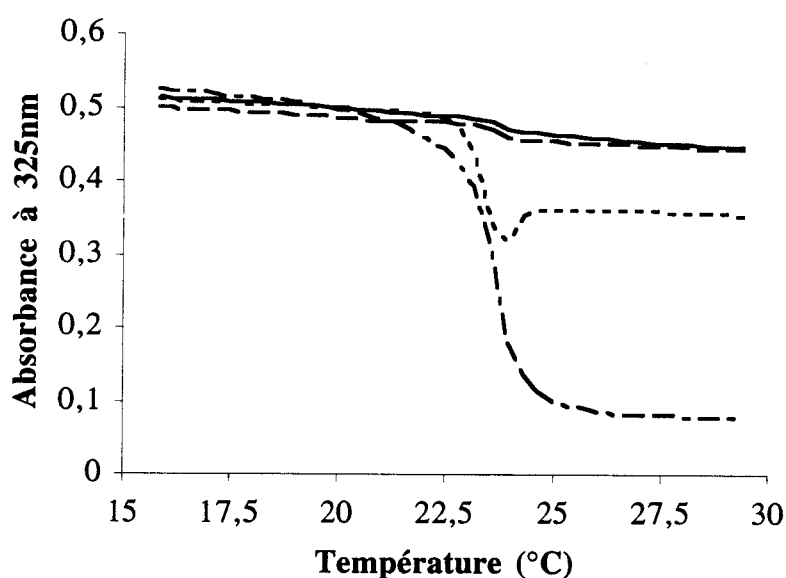
Certaines expériences ont nécessité un marquage des peptides. A cette fin, les peptides apoA-I [166-183], [161-183], et [145-183] ont été synthétisés suivant le protocole précédemment décrit puis marqués avec un groupement fluorescent : le dansyl (5-diméthylamino-1-naphtalènesulfonyl). La sonde fluorescente a été couplée après clivage du groupement t-Boc N-terminal, en utilisant 5 équivalents de chlorure de dansyl (5-diméthylamino-1-naphtalènesulfonyl) et 2 équivalents de DIEA dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , pendant 1 heure à température ambiante. Un second couplage s'est avéré nécessaire pour obtenir un test de Kaiser négatif (fiche technique N°1), marquant la disparition de toutes les fonctions amines réactives. Le clivage de la résine, la purification, l'identification et la vérification de l'homogénéité des peptides purifiés ont été identiques à ceux indiqués précédemment pour les peptides non marqués.

### **5. ASSOCIATION DES PEPTIDES AVEC LES PHOSPHOLIPIDES**

#### **5.1. Mesures de turbidité**

La formation de petits complexes discoïdaux en présence de peptides et de vésicules multilamellaires de phospholipides (DMPC) a été étudiée par un suivi de la turbidité du mélange (absorption à 325 nm) en fonction de la température. Un gradient de température (15 à 30 °C en 20 minutes) a été appliqué à un mélange 2/1 (en masse) DMPC/peptides au moyen d'une cuve thermostatée. Un témoin négatif, le DMPC seul, et un témoin positif, l'apoA-I native, obtenue par la technique classique de purification de l'apolipoprotéine A-I<sup>253</sup> ont été utilisés

simultanément. Une diminution de la turbidité du mélange traduit une transformation des vésicules de phospholipides multilamellaires en complexes discoïdaux DMPC/peptides. Les résultats obtenus sont indiqués sur la **figure 13**. Ils révèlent un comportement différent des trois peptides vis-à-vis des vésicules multilamellaires. Les 2 peptides les plus courts (résidus 166-183 et 161-183) produisent un effet minime sur la turbidité du milieu puisque la diminution de l'absorption observée à 325 nm est comparable à celle obtenue avec le DMPC seul. En revanche, le plus long peptide (résidus 145-183) induit une diminution significative de la turbidité. Cette diminution de la turbidité reste cependant limitée et correspond à environ 30% de la diminution observée avec l'apoA-I native.



**Figure 13. Variation de turbidité de mélanges DMPC/peptides en fonction de la température, mesurée par suivi de l'absorption à 325 nm.**

Trait plein : apoA-I [166-183]

Tirets : apoA-I [161-183]

Pointillés : apoA-I [145-183]

Tirets-pointillés : apoA-I native

## 5.2. Affinité des peptides pour les phospholipides

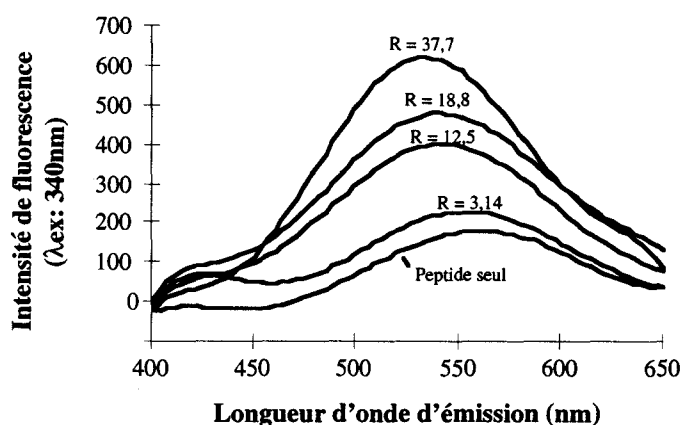
Pour les mesures d'affinité, il est nécessaire de se placer dans les conditions d'équilibre de la formation des complexes, c'est-à-dire dans des conditions telles que l'interaction phospholipides/peptides soit réversible et rapide. Pour cela, il faut se placer à une température supérieure à la température de transition du phospholipide utilisé. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi de travailler avec des phospholipides de type EggPC (mélange de phospholipides saturés et insaturés extraits d'oeufs) dont la température de transition est aux

environs de 0°C. Leur utilisation a ainsi permis de travailler à une température proche de la température ambiante. L'utilisation du DMPC (T° de transition : 23°C) aurait demandé des conditions de température d'incubation supérieures à 30°C, nécessitant une colonne thermostatée pour la purification des complexes.

De grandes vésicules multilamellaires (MLV) de EggPC (Sigma) ont été produites par dissolution des phospholipides dans du chloroforme, évaporation du solvant à l'azote, évaporation sous vide des traces de solvant résiduelles (2 heures) et reprise par un tampon 5 mM Tris-HCl pH 8,1 de manière à obtenir une concentration finale de 5 mg/ml. La dispersion du lipide dans le tampon était considérée comme totale lorsque la suspension était homogène et que plus aucune trace de lipide ne pouvait être décelée sur les parois du tube. La production de petites vésicules unilamellaires (SUV) a été assurée par sonication du mélange suivant une variante de la technique décrite par Huang<sup>254</sup>.: 3 séries de 7 min à une puissance de 32 W, avec un temps de repos de 2 minutes entre chaque série. La régulation de la température était assurée par un bain-marie thermostaté à 22°C et l'oxydation des phospholipides limitée grâce à un flux d'azote à la surface du milieu réactionnel. Le mélange a ensuite été déposé sur une colonne de gel filtration Sepharose CL 4B donnant un premier pic contenant les MLV et un second pic correspondant aux SUV qui ont été récupérées et dosées par colorimétrie à l'aide d'un kit enzymatique commercial (Biomerieux, France) pour donner une concentration finale de 352 µg de EggPC par ml.

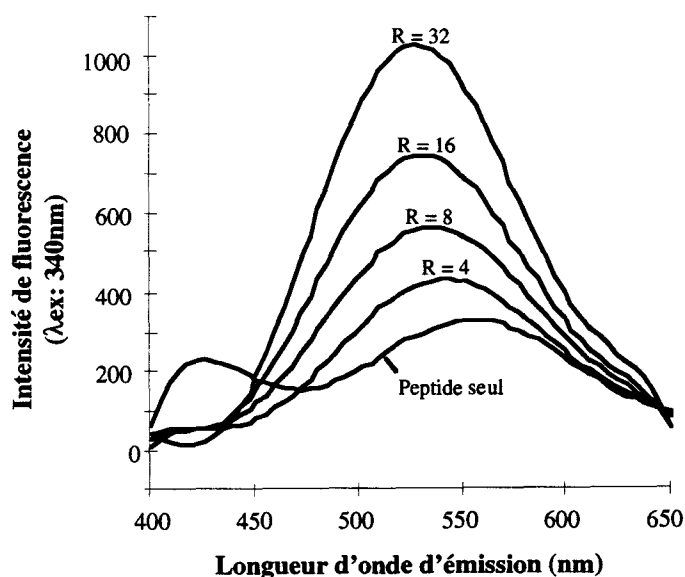
Des quantités constantes de petites vésicules unilamellaires de phospholipides (130 µg) ont été incubées à volume constant (450 µl) pendant 16 heures à 15°C en présence de quantités variables (15 à 50 µg) de peptides apoA-I [166-183] et [145-183] dansylés. ensuite, 200 µl de chaque mélange incubé ont été déposés sur une colonne (300 x 7,8 mm) HPLC Bio-Sil SEC 250-5 TSK, équilibrée dans un tampon Tris-HCl 5 mM pH 8,1. La séparation des complexes était complète en moins de vingt minutes et l'élution des complexes EggPC/peptides intervenait au bout de 7 min. La détection des peptides dansylés a été obtenue grâce à un spectrofluorimètre Jasco 800-21 FP aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 340 et 550 nm respectivement. La surface des pics correspondant a ensuite été normalisée en concentration de peptides.

Le rendement quantique du chlorure de dansyl augmente en présence de phospholipides<sup>255</sup>. Un coefficient de correction a donc été calculé pour chacun des peptides. Afin de déterminer ce coefficient, des quantités croissantes de phospholipides ont été ajoutées à des quantités constantes de peptides dansylés. Pour chaque rapport phospholipides/peptide, la fluorescence du dansyl a été mesurée. Sur les **figures 14** (apoA-I [166-183]) et **15** (apoA-I [145-183]), l'augmentation de la fluorescence corrigée (soustraction du blanc) en fonction de la quantité de phospholipides présente dans le mélange est clairement démontrée.



**Figure 14: Spectres de fluorescence du peptide apo A-I [166-183] dansylé en présence de quantités variables de phospholipides (EggPC).**

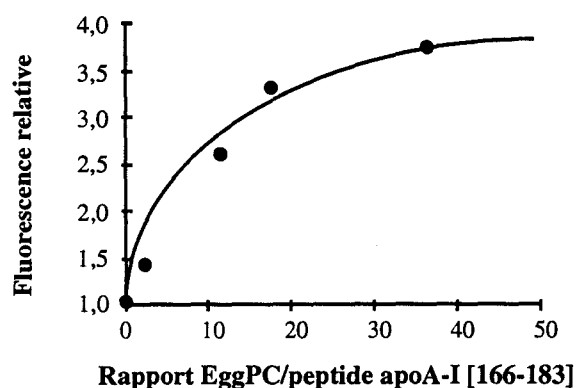
Les rapports (en masse) phospholipides/peptide utilisés sont indiqués pour chaque spectre. Les données présentées sont des données corrigées, un blanc tampon seul ou tampon+EggPC ayant été soustrait pour chaque série de points. Longueur d'onde d'excitation du fluorimètre : 340 nm.



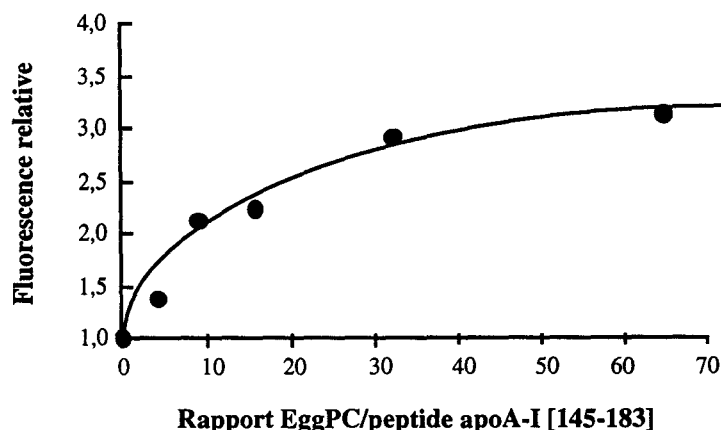
**Figure 15: Spectres de fluorescence du peptide apo A-I [145-183] dansylé en présence de quantités variables de phospholipides (EggPC).**

Les rapports (en masse) phospholipides/peptides utilisés sont indiqués pour chaque spectre. Les données présentées sont des données corrigées, un blanc tampon seul ou tampon+EggPC ayant été soustrait pour chaque série de points. Longueur d'onde d'excitation du fluorimètre : 340 nm.

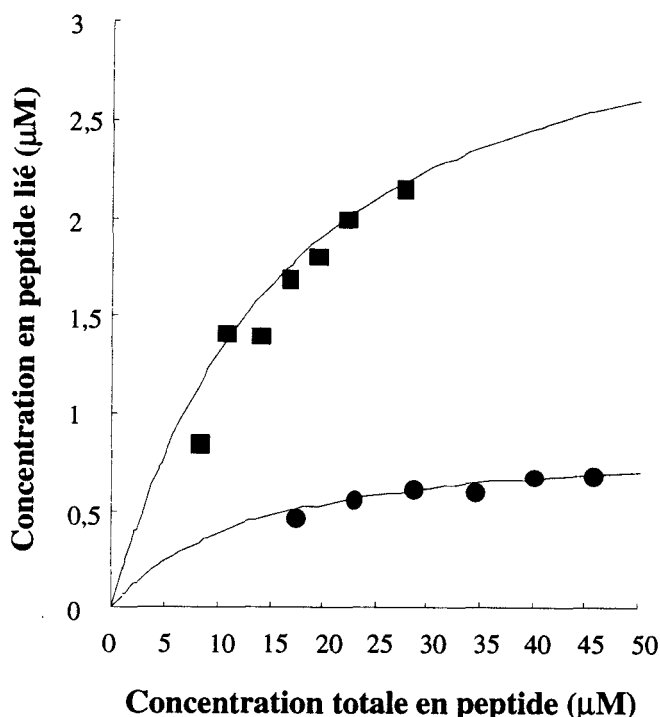
Cette augmentation de l'intensité de fluorescence atteint un plateau au delà d'un rapport phospholipides/peptide critique (figures 16 et 17). Le rapport de l'intensité de la fluorescence du peptide dansylé au plateau sur l'intensité de la fluorescence du peptide dansylé seul a été utilisé comme coefficient de correction pour la normalisation de la concentration en peptide sur le profil de gel filtration. Cette valeur permet d'obtenir le profil d'équilibre de la liaison EggPC/peptide présenté sur la figure 18.



**Figure 16: Influence du rapport phospholipides/peptide sur la fluorescence du peptide apoA-I [166-183] dansylé.**  
Au plateau, un coefficient de correction a été déterminé :  $K_c = 3,8$ .



**Figure 17: Influence du rapport phospholipides/peptide sur la fluorescence du peptide apoA-I [145-183] dansylé.**  
Au plateau, un coefficient de correction a été déterminé :  $K_c = 3,2$ .



**Figure 18. Association des peptides apoA-I [166-183] et [145-183] avec des vésicules unilamellaires de EggPC.**

(■) : association du peptide apoA-I [145-183] avec le EggPC à  $3,95 \cdot 10^{-4}$  M

(●) : association du peptide apoA-I [166-183] avec le EggPC à  $3,65 \cdot 10^{-4}$  M.

Les paramètres d'affinité de l'association ont été calculés par linéarisation suivant l'équation (2) où  $P_f$  représente la concentration en peptide libre ( $\mu\text{M}$ ),  $P_b$  celle du peptide lié ( $\mu\text{M}$ ),  $K_d$  la constante de dissociation des complexes EggPC/peptides,  $[\text{PC}]$  la concentration en EggPC utilisée ( $\mu\text{g/ml}$ ) et  $N$  la capacité maximale d'association.

$$P_f = N \cdot \left( \frac{P_f \cdot [\text{PC}]}{P_b} \right) - K_d \quad (2)$$

Cette linéarisation est présentée sur la **figure 19** et les paramètres de l'association EggPC/peptides sont répertoriés dans le **tableau 4**. Les résultats montrent que les deux peptides étudiés ont des constantes de dissociation équivalentes vis-à-vis des phospholipides alors que leurs capacités maximales d'association diffèrent. La similarité des constantes de dissociation suggère que les peptides apoA-I [166-183] (18-résidus) et apoA-I [145-183] (39-résidus) possèdent des affinités comparables pour les phospholipides. Cependant, une capacité d'association 3,5 fois plus importante est observée pour le peptide apoA-I [145-183] ( $8,5 \cdot 10^{-3}$  mole de peptide/mole de phospholipides) comparée au peptide apoA-I [166-183] ( $2,4 \cdot 10^{-3}$  mole de peptide/mol de PL).

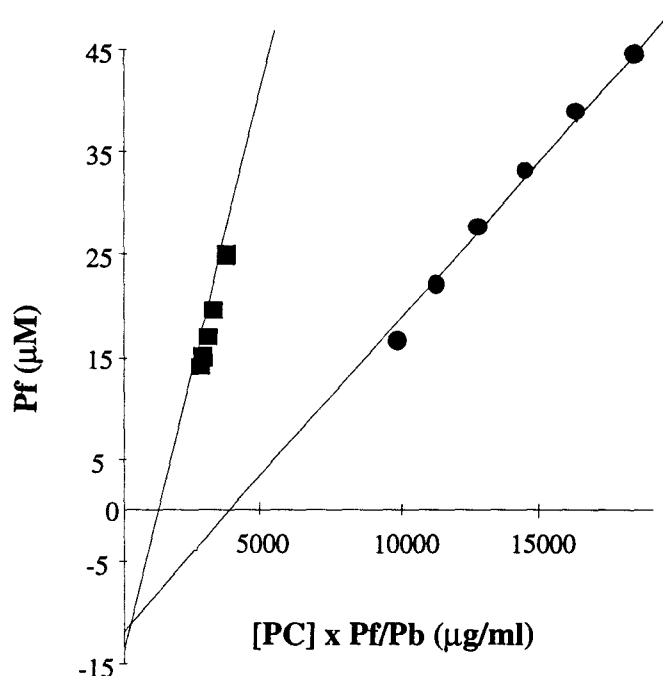


Figure 19. Linéarisation de l'association des peptides apoA-I [166-183] et apoA-I [145-183] avec des vésicules unilamellaires de EggPC.

(■) : peptide apoA-I [145-183]

(●) : peptide apoA-I [166-183].

Les coefficients de corrélation ( $r^2$ ) des linéarisations sont respectivement 0,994 et 0,979 pour le peptide apoA-I [166-183] et le peptide apoA-I [145-183].

Tableau 4. Constantes de dissociation ( $K_d$ ) et capacités maximales d'association ( $N$ ) des peptides apoA-I [145-183] et apoA-I [166-183] avec le EggPC.

Ces paramètres sont déterminés conformément à la linéarisation de l'équation 2. Les écarts types pour la mesure du  $K_d$  étaient de 11 et 4% pour les peptides apoA-I [166-183] et [145-183], respectivement

Peptides	$K_d$		$N$	
	$\mu M$	$g/l$	mole/mole <sup>(a)</sup>	$g/g$ <sup>(b)</sup>
ApoA-I [166-183]	11,9	$26 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-3}$
ApoA-I [145-183]	13,7	$63 \cdot 10^{-3}$	$8,5 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$

(a) : mole de peptide par mole de phospholipides.

(b) : gramme de peptide par gramme de phospholipides.



## 6. RECONSTITUTION ET CARACTERISATION DE HDL DISCOÏDALES

### 6.1. Reconstitution et purification des HDL reconstituées

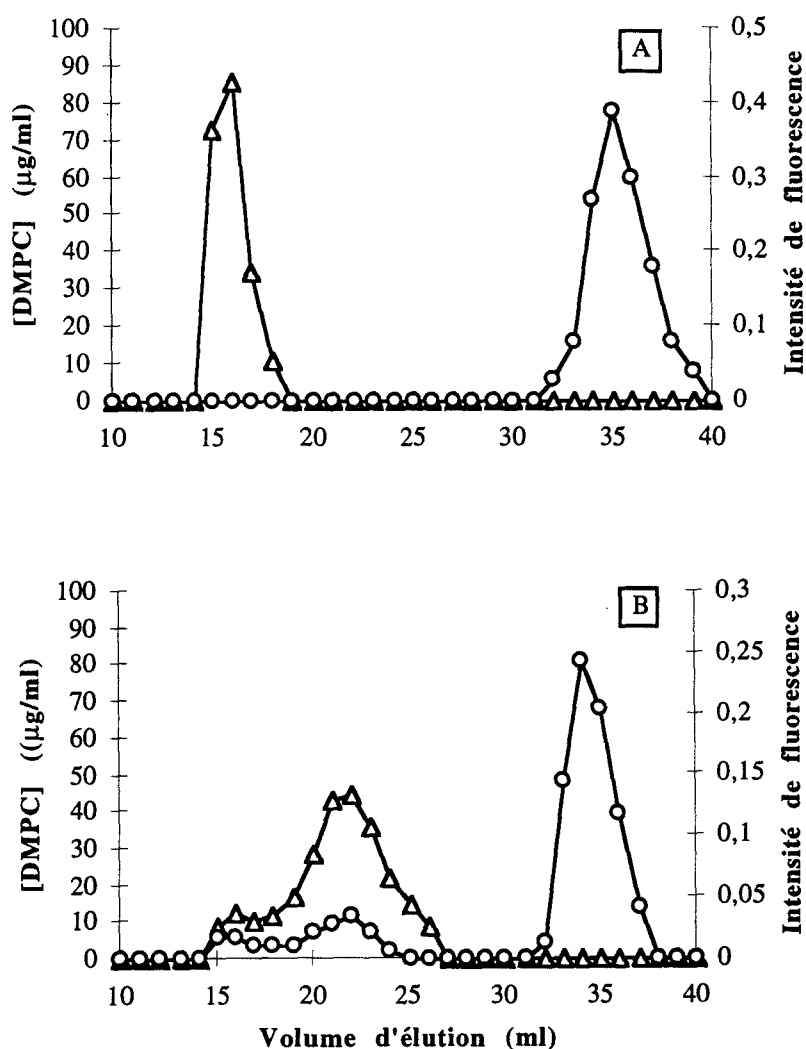
Deux types de phospholipides ont été utilisés pour les essais de reconstitution d'HDL discoïdales : le 1-2-dimyristoyl-glycérophosphatidylcholine (DMPC) et le 1-2-dipalmitoyl-glycérophosphatidylcholine (DPPC). Leurs températures de transition sont respectivement 23°C et 41°C.

La méthode utilisée pour obtenir des petites vésicules unilamellaires de DMPC est identique à celle utilisée avec le EggPC pour la mesure des constantes d'association (voir paragraphe précédent). L'incubation avec les peptides a été réalisée avec un rapport DMPC/peptides de 2/1 (en masse) à la température de 25°C pendant 16 heures, dans un tampon Tris/HCl 10 mM pH 8,1.

La technique utilisée pour l'obtention des petites vésicules unilamellaires de DPPC fait intervenir un détergent, le cholate de sodium (sel de sodium du 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oïc acide). Le DPPC a d'abord subi une dispersion dans un tampon Tris/HCl 10 mM pH 8,1 (solubilisation dans le chloroforme, séchage à l'azote, évaporation sous vide des résidus de solvant, reprise par le tampon et agitation jusqu'à obtention d'une suspension homogène). Cette suspension de DPPC a ensuite été solubilisée dans une solution à 6,5 mg/ml de cholate de sodium en incubant le mélange à 43°C pendant 2 heures selon un rapport cholate/DPPC de 1,7 (en masse). Cette opération permet d'obtenir de petites vésicules unilamellaires de DPPC. Un mélange cholate/DPPC/peptide a ensuite été préparé dans la proportion 5/3/1 (en masse) et incubé à 43°C pendant 16 heures. L'élimination du cholate aurait pu se faire par dialyse contre le tampon à 43°C mais nous avons préféré utiliser une technique plus rapide, décrite par Bonomo et Swaney<sup>154</sup>. Cette méthode permet la séparation du cholate de sodium par chromatographie d'adsorption sur Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) au moyen d'une micro-colonne Quick-sep (Isolab). Le rendement d'élimination du cholate de sodium par cette méthode est supérieur à 99,7%.

La purification des complexes DMPC/peptides et DPPC/peptides a été réalisée par chromatographie de gel filtration sur une colonne Superose 6HR à température ambiante. Les fractions obtenues ont ensuite été caractérisées du point de vue de leur contenu en peptide grâce à la fluorescence de la tyrosine ( $\lambda_{\text{abs}}=280$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=305$  nm) et du point de vue de leur concentration en phospholipides à l'aide d'un kit de dosage enzymatique (PAP 150, Biomerieux). Les profils de séparation correspondant aux peptides apoA-I [166-183] et [145-183] en présence de DMPC sont représentés sur la **figure 20**. Ces profils montrent clairement que ces peptides possèdent des capacités différentes pour la reconstitution d'HDL discoïdales.

En effet, pour le peptide apoA-I [166-183], aucun complexe stable ne se forme, puisqu'aucun pic n'est élué entre le volume mort représentant les vésicules de DMPC libres (12-17 ml) et le pic correspondant au peptide libre qui est élué en dernier (30- 40 ml). En revanche, le profil correspondant au peptide est très différent. Un pic intermédiaire (entre 18- 28 ml) apparaît entre le pic de vésicules lipidiques et le pic du peptide libre. Le matériel élué contient, à la fois, du peptide et des phospholipides, et correspond à des complexes DMPC/peptides. Cependant, le rendement en peptide complexé (peptide complexé/peptide total) reste faible pour le peptide apoA-I [145-183] (22%) si on le compare à celui de l'apoA-I native pour laquelle on obtient 100% de rendement de complexation.



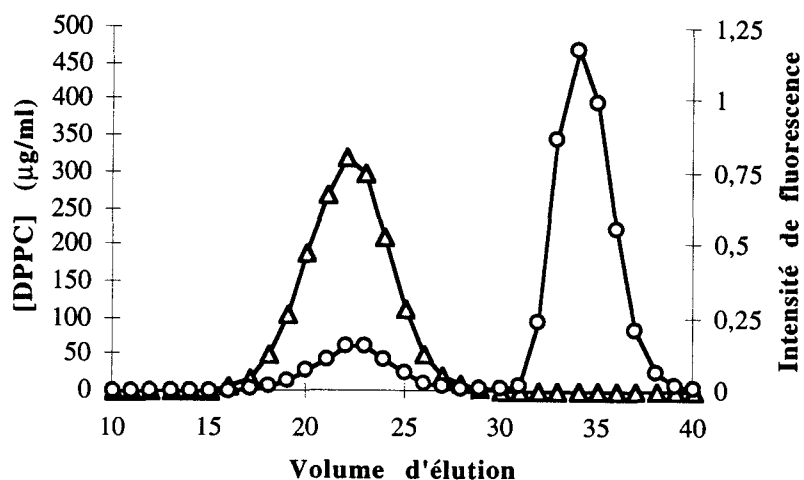
**Figure 20. Profils de séparation des complexes DMPC/peptides sur colonne superose 6PG.**

La concentration en lipides en µg/ml (Δ) et l'intensité de fluorescence de la tyrosine (○) sont représentées en fonction du volume d'élution de la colonne.

A : DMPC/apoA-I [166-183]

B : DMPC/apoA-I [145-183]

Le profil résultant de la séparation sur la même colonne du mélange DPPC/peptide apoA-I [145-183], après incubation et élimination du cholate (**figure 21**), révèle un comportement identique à celui observé avec le DMPC.



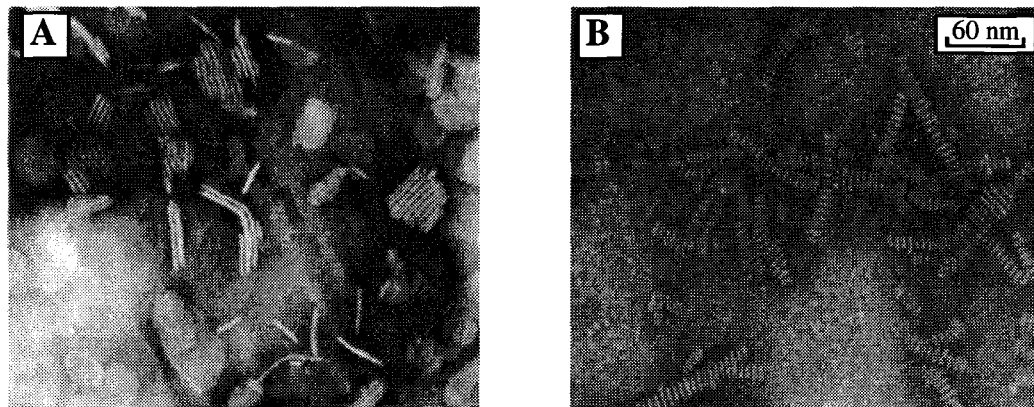
**Figure 21. Profils de séparation des complexes DPPC/apoA-I [145-183] sur colonne Superose 6HR.**

La concentration en lipides en µg/ml (Δ) et l'intensité de fluorescence du tryptophane (O) sont représentés en fonction du volume d'élué de la colonne.

Les profils de séparation des mélanges DMPC/ et DPPC/peptide apoA-I [145-183] confirment donc les résultats préliminaires obtenus par mesure de turbidité. Parmi les 3 peptides synthétisés, seul le peptide apoA-I [145-183] semble posséder une capacité d'association avec les phospholipides suffisante pour former des complexes. En conséquence, l'étude physico-chimique des HDL reconstituées avec les segments peptidiques, décrite dans la suite de ce chapitre, ne concernera que le peptide apoA-I [145-183].

## 6.2. Microscopie électronique

Afin de déterminer la forme et l'homogénéité des particules formées, nous avons utilisé la microscopie électronique. Ces photos ont été prises par le Dr J. Baert (Université Catholique de Louvain, Campus de Courtrai, Belgique).



**Figure 22.** HDL reconstituées avec le peptide apoA-I [145-183] ou l'apoA-I native et le DMPC, observées par microscopie électronique.

A : apoA-I [145-183]

B : apoA-I native.

Les HDL reconstituées et purifiées ont été dialysées pendant une nuit contre un tampon acétate d'ammonium 125 mM/hydrogénocarbonate d'ammonium 2,6 mM à pH 7,4. Après dialyse, chaque solution de complexes a été ajustée à la concentration de 150 µg/ml. Les échantillons ont ensuite été colorés négativement par une solution à 20 g/l de phosphotungstate de potassium à pH 7,4. Pour cela, un mélange complexes/solution de coloration (2/1, en volume) a été agité au vortex. 7 µl de ce mélange ont finalement été appliqués sur la face mate d'un support carboné (Formvar), et séchés après 30 secondes d'imprégnation. L'examen a été réalisé sur un microscope électronique à transmission Zeiss EM 10C (Allemagne) opérant à 60 kV.

Les analyses de microscopie électronique des complexes formés entre le DPPC et le peptide apoA-I [145-183] (**Figure 22**) révèlent des profils typiques en rouleaux, caractéristiques de disques entassés les uns sur les autres. Cette disposition en rouleaux constitue en réalité un artefact, dû à la technique de coloration négative utilisée. Les HDL reconstituées DPPC/apoA-I [145-183] se présentent donc sous la forme de disques comme les complexes formés entre le DPPC et l'apoA-I. Cependant les disques formés avec le peptide semblent nettement plus grands que ceux obtenus avec la protéine entière. De plus, la taille des

particules reconstituées avec l'apoA-I native apparaît homogène tandis qu'avec le peptide, une distribution plus hétérogène de la taille des complexes est observée. Les caractéristiques physiques des HDL reconstituées avec le peptide apoA-I [145-183] semblent donc différentes de celles observées avec l'apoA-I native, bien que tous deux forment des particules discoïdales en présence de phospholipides.

### 6.3. Caractérisation physico-chimique des HDL reconstituées

Les propriétés physico-chimiques des complexes discoïdaux DMPC/ ou DPPC/apoA-I [145-183] et DMPC/ ou DPPC/apoA-I ont été caractérisées. Le rapport moyen phospholipides/peptide ou /protéine a été calculé à l'aide des dosages des phospholipides (PAP 150, Biomerieux) d'une part, et de protéine ou de peptide, d'autre part. La quantité d'apoA-I dans les complexes a été obtenue grâce à un dosage de Lowry en utilisant de l'apoA-I purifiée comme référence. En ce qui concerne le peptide, une analyse d'acides aminés a été réalisée sur un analyseur Beckman 6300 haute performance (Fullerton, USA) après hydrolyse acide totale (HCl 6N pendant 24 heures et sous vide). Le nombre de moles de protéine par mole de complexe (n) a ensuite été calculé, en utilisant la masse du complexe mesurée en gel filtration et le rapport molaire phospholipides/peptide. Enfin, le rayon (R) des particules discoïdales a été déterminée de deux façons :

1- grâce au volume d'élution correspondant au sommet du pic de particules sur la colonne de fractionnement Superose 6 PG, après étalonnage de celle-ci par un mélange de 7 protéines de rayon de Stokes connu.

2- par un calcul théorique (équation 3) utilisant le rapport molaire phospholipides/peptide ( $R_m$ ), le nombre de molécules de peptide ou de protéine par complexe (n), et la surface théorique moyenne d'une molécule de phospholipide dans une bicouche ( $0,55 \text{ nm}^2$ ).

$$R(\text{nm}) = \sqrt{\frac{R_m \cdot n \cdot 0,55}{\pi}} \quad (3)$$

Les caractéristiques principales des HDL discoïdales reconstituées avec l'apoA-I native ou le peptide apoA-I [145-183] et les 2 types de phospholipides sont présentés dans le **tableau 5**. On peut observer que les complexes reconstitués avec le DMPC et le DPPC ont des caractéristiques physiques et chimiques comparables, quelle que soit la molécule amphipathique utilisée. En revanche, ces données montrent que les caractéristiques physico-chimiques des HDL reconstituées avec le peptide apoA-I [145-183] diffèrent radicalement de celles des

complexes obtenus avec l'apoA-I native . En particulier les complexes DMPC et DPPC/peptide ont un rayon de Stokes 2 fois plus grand et un rapport molaire cinq fois plus important.

**Tableau 5. Composition chimique et taille des HDL reconstituées avec l'apoA-I ou le peptide apoA-I [145-183] et le DMPC ou le DPPC.**

Peptide ou protéine	Rapport molaire PL/prot (a) $R_m$	nombre PL/hélice théorique	nombre hélices théoriques/complexe	mole prot/complexe n	rayon de Stokes mesuré (nm) (b)	rayon de Stokes calculé (nm) (c)
<b>Peptide apoA-I [145-183]</b>						
DMPC	101	50	16	8	12,4	11,9
DPPC	100	50	16	7	11,8	11,1
<b>Apo A-I native</b>						
DMPC	91	15	12	2	5,7	5,6
DPPC	85	14	12	2	5,5	5,4

(a) : PL : phospholipides, prot : apoA-I native ou peptide apoA-I [145-183]

(b) : mesuré en fonction du volume d'élution du complexe sur la colonne Superose 6PG

(c) : calculé selon l'équation (3)

#### 6.4. mesures de turbidité

Afin de documenter de façon plus complète la stabilité de l'association DMPC/peptide, nous avons préparé des complexes DMPC/apoA-I [145-183] en incubant plusieurs mélanges DMPC/peptide différents à 25°C, pendant 16 heures. Cinq incubations ont été réalisées, en utilisant les rapports lipides/peptide initiaux suivants : 4/1, 3/1, 2/1, 1/1, 0,5/1 en masse. Les mélanges sont restés turbides lors de leur incubation à 25°C mais ils se sont ensuite clarifiés progressivement au cours du refroidissement à température ambiante.

Deux autres suivis de turbidité en fonction de la température ont été réalisés en utilisant des gradients croissant (**figures 23**) et décroissant de température (**figures 24**) sur les complexes obtenus précédemment. Les deux mesures montrent que la turbidité de chaque mélange lipides/peptide diminue dans une zone de température comprise entre 22,6°C et 24,6°C, c'est-à-dire à 1 degré de part et d'autre de la température de transition du DMPC. En dehors de cette étroite zone de température, les complexes semblent se dissocier et la turbidité du mélange augmente alors rapidement. La chute de turbidité la plus importante est observée pour le rapport DMPC/apoA-I [145-183] initial le plus grand (4/1) .

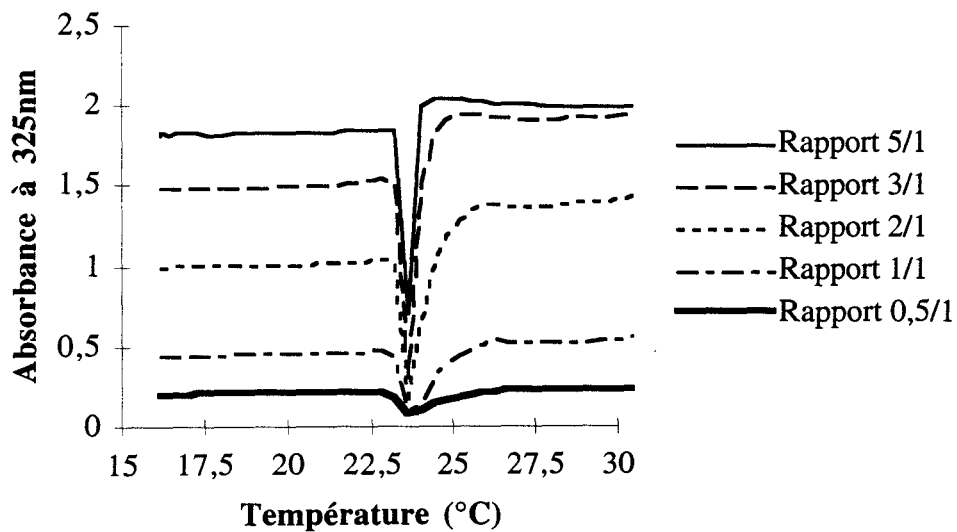


Figure 23. Suivi de la turbidité de mélanges DMPC/peptide apoA-I [145-183] à différents rapports massiques en fonction d'un gradient croissant de température.

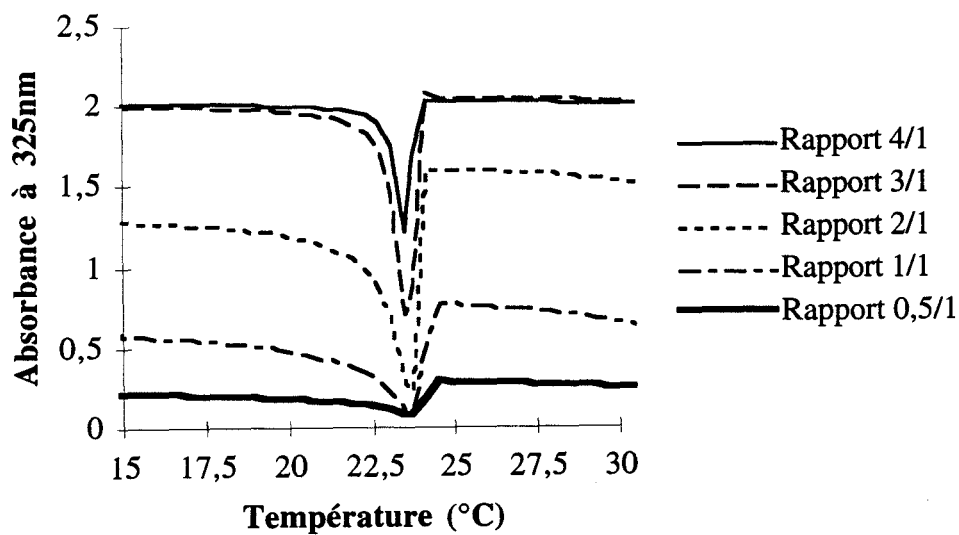


Figure 24. Suivi de la turbidité de mélanges DPPC/peptide apoA-I [145-183] à différents rapports massiques en fonction d'un gradient décroissant de température.

Cette approche a permis de confirmer que le peptide apoA-I [145-183] présente bien une affinité pour les vésicules de DMPC et qu'il permet la formation de HDL reconstituées. Cependant, cette affinité est loin d'être comparable à celle de l'apoA-I native, car on assiste à une dissociation partielle de ces complexes en dehors de la température de transition des phospholipides (DMPC), alors que les complexes reconstitués avec l'apoA-I humaine native restent stables.

### 6.5. Polarisation de fluorescence

L'effet des peptides ou des protéines sur la stabilité de la bicouche phospholipidique au sein de HDL reconstituées peut être évalué en suivant le degré de mobilité des chaînes alkyles des phospholipides en fonction de la température. La mobilité des chaînes hydrocarbonées a été suivie en mesurant la polarisation de fluorescence du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH). Ce composé hydrophobe et fluorescent s'intercale entre les chaînes alkyles des phospholipides. Un faisceau de lumière polarisée a été envoyé sur la solution de complexes dans lesquels le DPH avait été incorporé à raison de 1 mole de DPH pour 500 moles de phospholipides. Un gradient croissant de température (de 18°C à 45°C à 0,6°C/min), contrôlé par un thermostat programmable Julabo, a alors été appliqué et les mesures ont été réalisées sur un spectrofluorimètre Aminco SPF-500 aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives de 365 et 427 nm. Le degré de polarisation de fluorescence  $P$ , lié à la mobilité du marqueur et donc à la fluidité lipidique, se calcule par la relation (4) :

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (4)$$

où sont prise en compte les intensités de fluorescence mesurées parallèlement ( $I_{\parallel}$ ) et perpendiculairement ( $I_{\perp}$ ) à la direction de propagation de l'onde d'excitation.

Les mesures ont été réalisées sur les complexes DMPC/apoA-I [145-183] après purification sur Superpose 6PG afin de compléter l'étude de la stabilité de ces complexes. Des suspensions de petites vésicules unilamellaires (SUV) de DMPC ont été utilisées comme témoin. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 25**. Ils montrent que la fluidité des chaînes alkyles au sein des HDL reconstituées avec le peptide est très peu affectée par la



présence du peptide. En effet, la température de transition des phospholipides au sein des complexes, repérable par la chute de la polarisation de fluorescence, est très proche de la température de transition des phospholipides en l'absence de peptide. Ceci signifie que le peptide possède un effet de stabilisation modéré sur les chaînes alkyles des phospholipides au sein des complexes. Ce résultat suggère que, globalement, l'interaction avec les lipides engendrée par le peptide apoA-I [145-183] est moins forte que celle obtenue avec la protéine entière. En effet, un déplacement de la température de transition du DMPC atteignant 25,5°C a, été mis en évidence dans les complexes DMPC/apoA-I<sup>256</sup>. L'effet de coopérativité entre les paires adjacentes d'hélices de l'apoA-I native est un facteur qui semble intervenir sensiblement dans la capacité de la protéine à stabiliser les chaînes alkyles des phospholipides dans les HDL reconstituées. L'absence de cette coopérativité dans le peptide pourrait expliquer le manque de stabilisation des chaînes alkyles au sein des complexes phospholipides/peptide apoA-I [145-183].

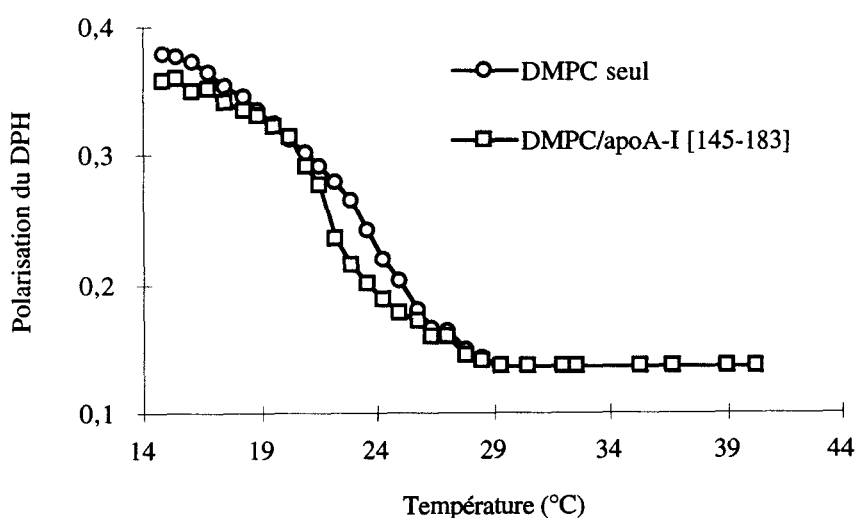


Figure 25. Suivi de la polarisation de fluorescence du 1,6 diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) au sein des complexes DMPC/peptide apoA-I [145-183] ou de simples vésicules de DMPC.

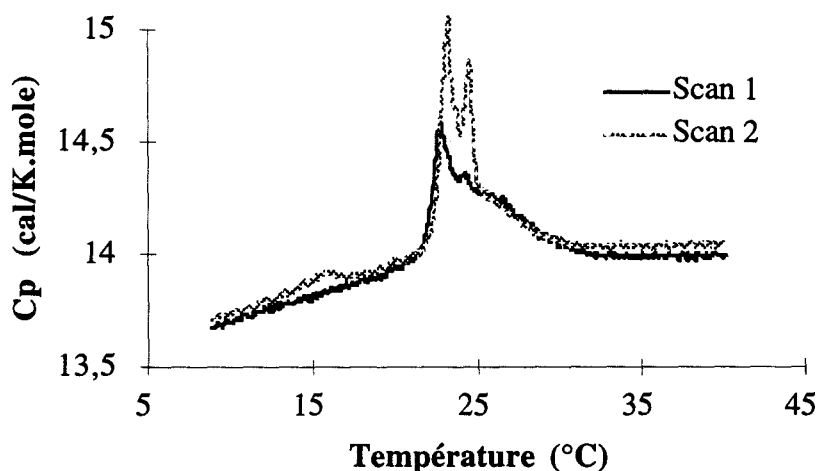
## 6.6. Calorimétrie

La quantification de la variation de l'enthalpie d'interaction entre une protéine ou un peptide et des lipides peut contribuer à évaluer l'énergie impliquée dans cette association, ainsi qu'à apprécier la stabilité des complexes formés. Cette variation d'enthalpie d'interaction peut

être déterminée par une méthode de mesure directe : la calorimétrie différentielle. Il s'agit de faire varier la température de l'échantillon de part et d'autre de la température de transition du lipide utilisé et de mesurer la variation d'enthalpie du système.

Les mesures de calorimétrie différentielle ont été réalisées sur un calorimètre microcal MC-2 (Amherst, MA) possédant 2 cellules (échantillon et référence) d'une capacité de 1,23 ml chacune. Une solution, contenant les complexes purifiés à la concentration de 1 mg de phospholipides par ml, a été introduite dans la cellule échantillon. Le balayage en température s'est effectué à la vitesse de 45°C/heure. Les données ont été collectées et analysées (températures de transition et variations d'enthalpies) avec le programme DA-2 (Microcal).

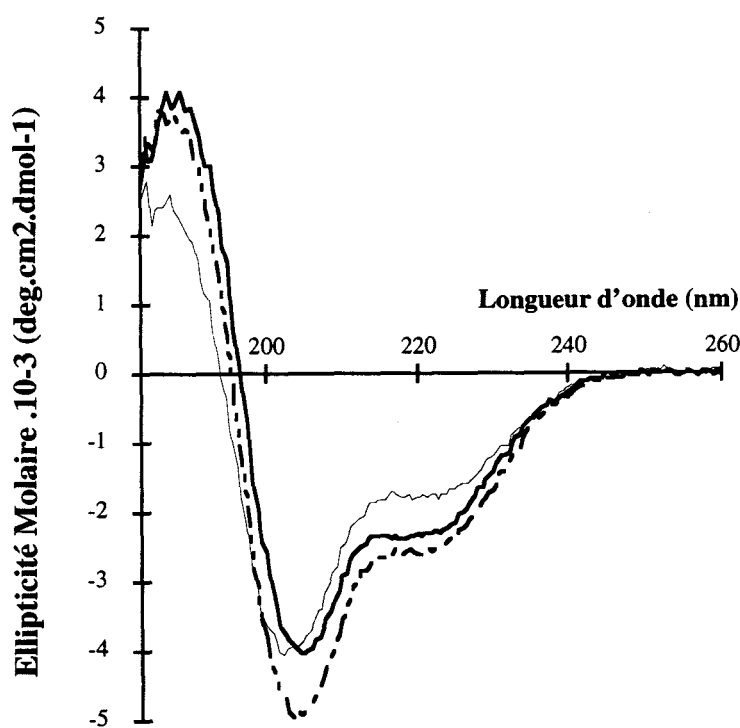
Le balayage calorimétrique des complexes DMPC/apoA-I [145-183] purifiés (**figure 26**) révèle la présence de 2 pics correspondants respectivement à la transition principale du DMPC associé au peptide (23,2°C) et à celle du DMPC pur (24,3°C). La répétition du balayage sur ce même échantillon entraîne une augmentation de l'intensité relative du pic de DMPC par rapport au pic correspondant aux complexes, confirmant l'instabilité des complexes formés entre le peptide apoA-I [145-183] et le DMPC.



**Figure 26. Mesure de la variation d'enthalpie de l'interaction lipides/peptide dans les complexes DMPC/apoA-I [145-183] en fonction de la température. Les scans 1 et 2 constituent 2 scans consécutifs d'un même échantillon de complexes purifiés.**

### 6.7. Etude de la structure secondaire des peptides par dichroïsme circulaire

Les méthodes de prédiction de structure secondaire et de modélisation moléculaire proposent pour le fragment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I une structure composée de 2 hélices  $\alpha$  séparées par une structure non hélicoïdale permettant l'inversion du sens de la chaîne peptidique (coude  $\beta$  ou brin  $\beta$ ). Afin de vérifier ces évaluations statistiques et mathématiques, des mesures expérimentales de dichroïsme circulaire ont été mises en oeuvre. Cette technique spectroscopique permet de déterminer la distribution des différents éléments de structure secondaire au sein d'un peptide ou d'une protéine. Le dichroïsme circulaire ne dispense cependant qu'une information globale sur la molécule analysée, sous la forme de pourcentage d'éléments de structure secondaire.



**Figure 27. Spectres de dichroïsme circulaire des peptides apoA-I [166-183], [161-183] et [145-183] à 23°C dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4.**

Ligne pleine forte : peptide apoA-I [166-183]  
Tirets : peptide apoA-I [161-183]  
Ligne pleine fine : peptide apoA-I [145-183].

Les spectres de dichroïsme ont été accumulés à température ambiante sur un spectropolarimètre JASCO 710 calibré à l'aide d'une solution d'acide (+)-10-camphorsulfonique 0,06% (en masse). Les échantillons ont été préparés à la concentration en

peptide de 0,1 mg/ml après dialyse contre un tampon phosphate 10 mM pH 7,4. Les mesures ont été réalisées dans une cuve cylindrique en quartz possédant un trajet optique de 0,1 cm. Pour chaque échantillon, 8 spectres ont été accumulés et moyennés sur la gamme de 260 à 184 nm avec une vitesse de balayage de 20 nm/min.

Les spectres présentés sur la **figure 27** sont ceux correspondant aux trois peptides en solution dans le tampon phosphate et corrigés par soustraction du spectre obtenu dans les mêmes conditions avec le tampon. La méthode de calcul que nous avons utilisée pour la détermination des pourcentages de structure secondaire des peptides est celle publiée par Compton et Johnson<sup>127</sup>. Elle fait intervenir une comparaison matricielle du spectre dichroïque de la molécule de structure inconnue avec les spectres dichroïques de 16 protéines dont la structure est connue. Les résultats obtenus par cette méthode d'analyse de spectres sont présentés dans le **tableau 6**. Les pourcentages d' $\alpha$ -hélicité des 3 peptides, apoA-I [166-183], [161-183], et [145-183], s'échelonnent entre 30 et 40%. Ces valeurs sont inférieures à celles attendues compte tenu des prédictions de structure présentées dans le chapitre III.2.1. Elles sont cependant supérieures à celles obtenues par Fukushima et coll.<sup>124</sup> qui observent par dichroïsme circulaire, 17% d'hélicité pour le fragment 121-164 et 15% pour le fragment 144-165 de l'apoA-I.

**Tableau 6. Pourcentages d' $\alpha$ -hélicité des peptides apoA-I [166-183], [161-183] et [145-183] déterminés par dichroïsme circulaire.**

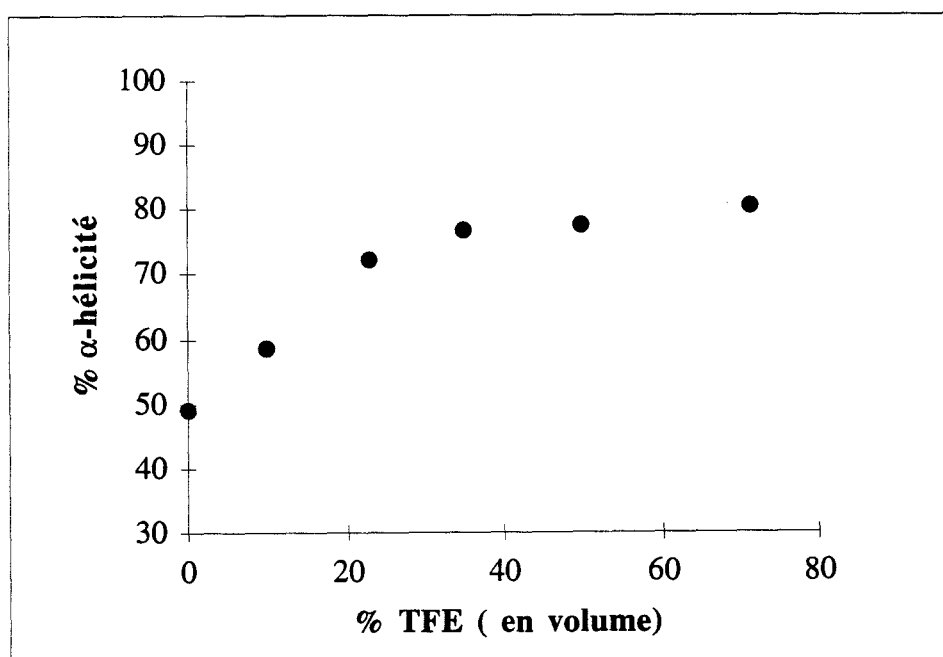
Les mesures ont été effectuées sur les peptides en solution dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4 ou dans un mélange TFE/tampon phosphate 10 mM pH 7,4 (1/1 en volume) et, pour le peptide apoA-I [145-183], sur les complexes DMPC/peptide purifiés.

Peptides	$\alpha$ -hélicité (%)		
	dans tampon phosphate 10 mM	mélange (1/1) TFE/tampon phosphate 10 mM	Associé aux DMPC dans les HDL reconstituées
apoA-I [166-183]	40	53	-
apoA-I [161-183]	31	52	-
apoA-I [145-183]	29	56	59

Les spectres des 3 peptides ont également été accumulés en solution dans une solution à 50% (en volume) de trifluoroéthanol (TFE) dans le tampon phosphate. Il s'agit d'un solvant organique qui possède une constante diélectrique et une polarité inférieures à celles de l'eau. Nous avons choisi une proportion de 50% en TFE car elle constitue la concentration minimale

de TFE entraînant la structuration hélicoïdale maximale de l'apoA-I native comme le montre la **figure 28**. Les spectres correspondant aux 3 peptides en solution dans le TFE 50% ont été corrigés par soustraction du spectre obtenu dans les mêmes conditions avec le mélange TFE 50%/tampon phosphate. Les valeurs de pourcentages d' $\alpha$ -hélicité correspondantes sont présentées dans le **tableau 6**. Les résultats obtenus dans le TFE sont en accord avec les travaux de Fukushima et coll.<sup>124</sup>. En effet, on observe dans ces conditions de solvation des pourcentages d' $\alpha$ -hélicité supérieurs à 50% pour les 3 peptides. Ces mesures confirment donc le potentiel et le caractère hélicoïdal des peptides apoA-I [166-183], [161-183], et [145-183].

Enfin, le pourcentage d'hélice  $\alpha$  du peptide apoA-I [145-183] complexé au DMPC atteint 59% dans le tampon phosphate et 56% en présence de TFE (**tableau 6**). Ce résultat montre que le segment [145-183] de l'apoA-I possède un repliement hélicoïdal maximal en présence de phospholipides, alors qu'en solution, ce peptide est incomplètement structuré. On peut émettre l'hypothèse qu'en présence de phospholipides, l'association (donc l'affinité) potentielle du peptide pour ceux ci, est une conséquence directe de la structuration du peptide.



**Figure 28.** Evolution du pourcentage d' $\alpha$ -hélicité de l'apoA-I native en fonction du pourcentage de TFE inclus dans l'échantillon.

L' $\alpha$ -hélicité est déterminée par la mesure du dichroïsme circulaire à 222 nm (minimum caractéristique de l' $\alpha$ -hélicité).

### 6.8. Etude structurale du peptide apoA-I [166-183] par RMN

La résonance magnétique nucléaire est une technique qui permet de déterminer la structure spatiale de molécules simples ou de macromolécules de taille modeste. Alors que le dichroïsme circulaire n'apporte qu'une information globale sur la structure secondaire de la molécule analysée, la RMN permet une approche beaucoup plus précise, non seulement de la structure secondaire mais également de la structure tertiaire. L'information structurale dans l'espace est obtenue principalement par la mesure de l'effet Overhauser des noyaux analysés<sup>257</sup> (on utilise souvent les protons de la molécule) qui permet d'estimer les distances entre atomes non contigus.

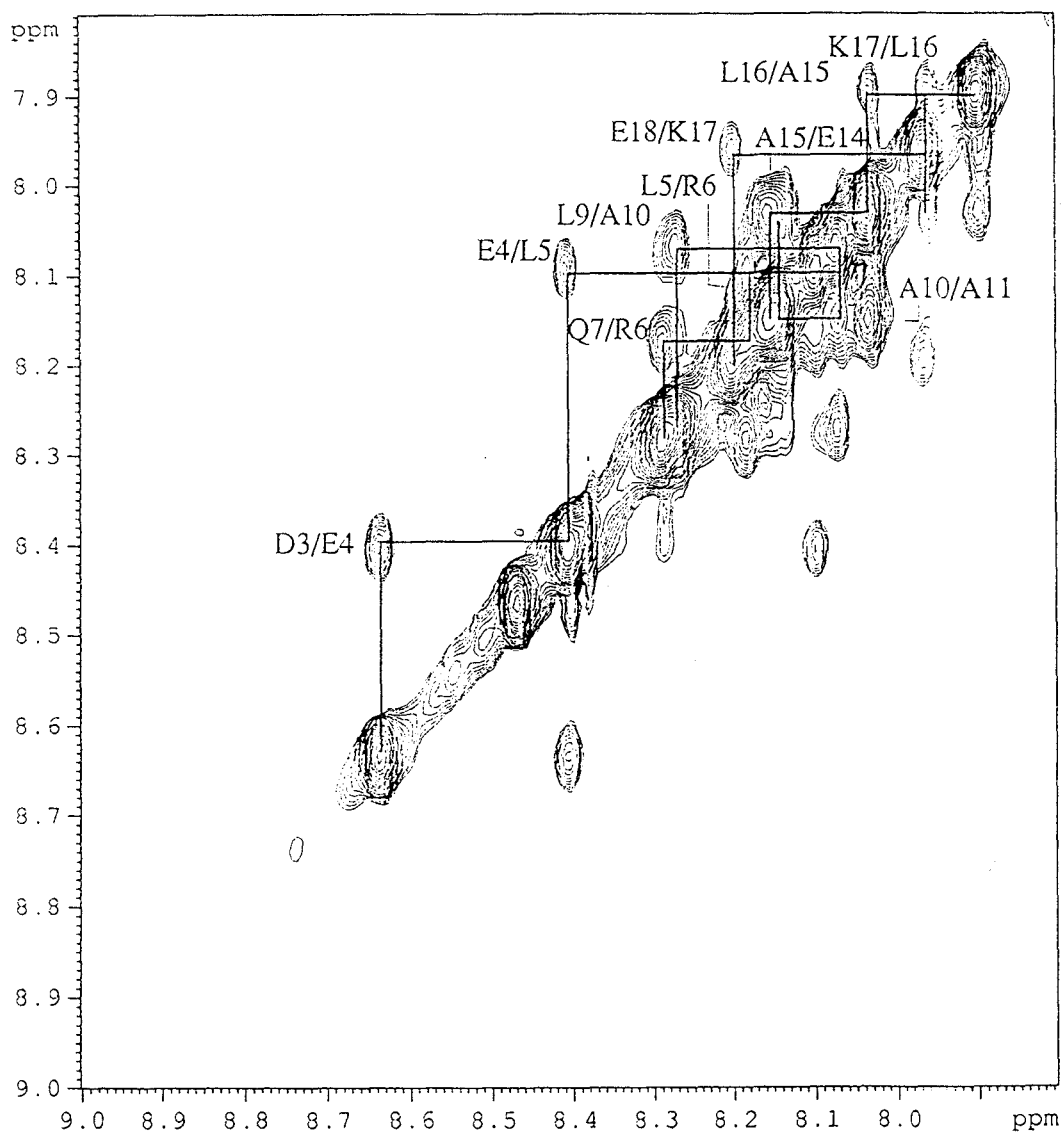


Figure 29. Spectre (<sup>1</sup>H) NOESY du peptide apoA-I [166-183] 5 mM, réalisé à 4°C, dans un mélange H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90/10, en volume) à pH 4.

Dans le but de réaliser une ligation chimique par liaison sulfure lors d'une étude ultérieure aux travaux qui viennent d'être exposés, le peptide apoA-I [166-183] avait également été synthétisé avec une cystéine en position C-terminale (peptide apoA-I [166-183]-Cys Ct). Ce peptide a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  et le spectre NOESY (*two dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy*) de ce peptide est présenté sur la **figure 29**. Ce spectre a été enregistré à 4°C sur un spectromètre Bruker 600-Mhz avec un temps de mélange de 200 ms. La concentration du peptide était 1 mM dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90/10 en volume) ajusté à pH 4. La **figure 30** présente les contacts NOE à faible distance suivants :

- $d_{\text{NN}}$ , contacts NOE entre 2 protons N—H
- $d_{\alpha\text{N}}$ , contacts NOE entre un proton  $\text{C}\alpha$ —H et un proton N—H
- $d_{\alpha\beta}$ , contacts NOE entre un proton  $\text{C}\alpha$ —H et un proton  $\text{C}\beta$ —H

Ces trois types de contacts ont été mesurés entre les acides aminés  $i$  et  $i+1$ ,  $i+2$ ,  $i+3$ , ou  $i+4$ . Sur la **figure 30**, l'intensité du contact est proportionnelle à la largeur des lignes reliant les acides aminés de la séquence. Ces intensités sont classées en trois catégories : les contacts forts correspondant à des distances atomiques inférieures à 0,27 nm, les contacts moyens pour les distances atomiques comprises entre 0,27 et 0,33 nm, et les contacts faibles correspondant à des distances atomiques comprises entre 0,33 et 0,5 nm.

Ramenés à la séquence d'un peptide, ces contacts NOE permettent de déterminer le type de structuration secondaire adoptée. Dans le cas d'une l'hélice  $\alpha$  parfaite, ces contacts s'établiront comme suit :

- $d_{\text{NN}}(i,i+1)$  : contacts forts.
- $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$  : contacts moyens
- $d_{\text{NN}}(i,i+2)$  : peu de contacts
- $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$  : contacts moyens
- $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$  : contacts forts
- $d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$  : contacts moyens

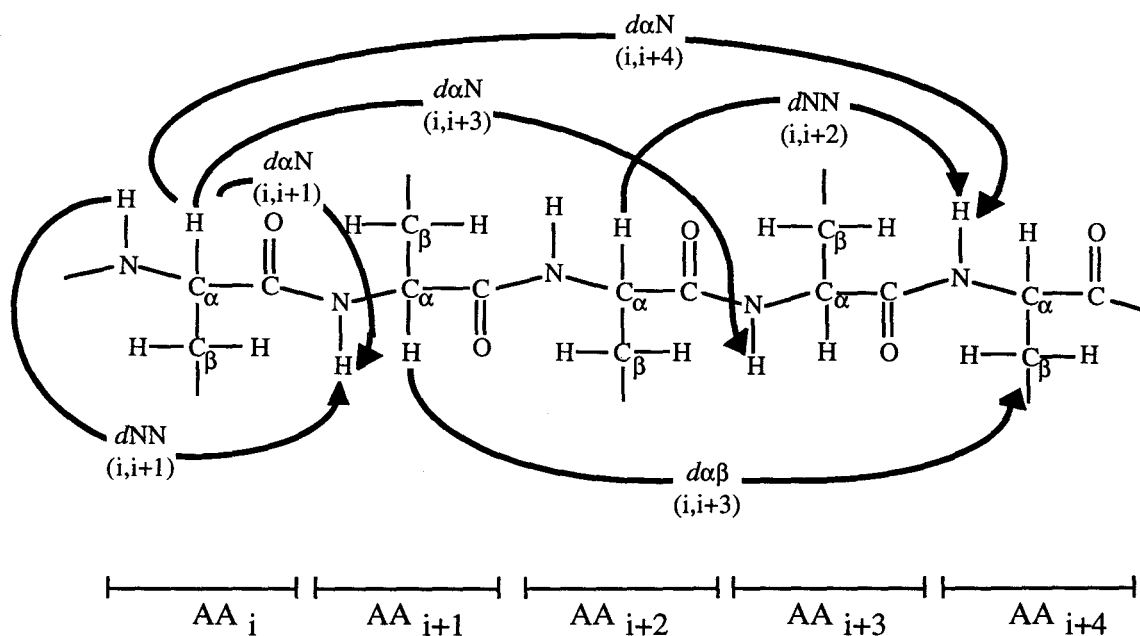
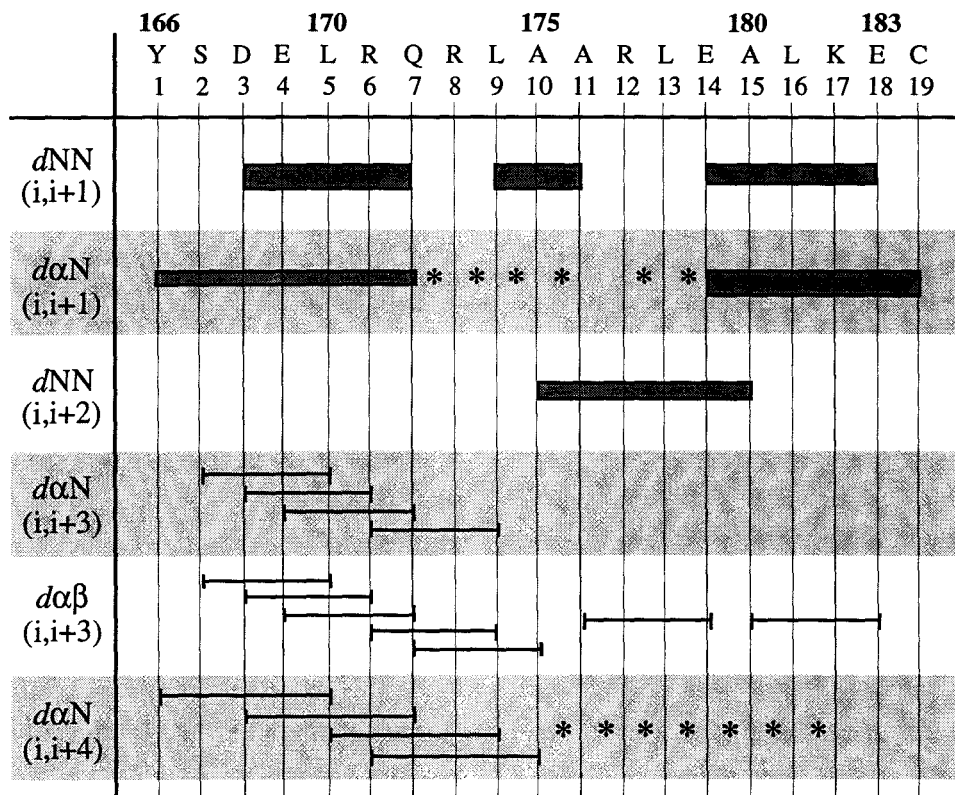


Figure 30. Contacts NOE (*nuclear Overhauser effect*) à faible distance observés sur le spectre NOESY du peptide apoA-I [166-183]-Cys C-t de l'apoA-I.

- █ Contact NOE fort (< 0,27 nm)
- █ Contact NOE moyen (0,27 nm à 0,33 nm)
- Contact NOE faible (0,33 à 0,50 nm).

Les astérisques marquent la présence de données non exploitables pour cause de recouvrements.



Sur la **figure 30**, on constate la présence de nombreux contacts NOESY  $d_{NN(i,i+1)}$  forts caractéristiques d'une hélice  $\alpha$ . Sur 18 contacts  $d_{NN(i,i+1)}$  possibles, 10 sont observés, suggérant une importante structuration en  $\alpha$ -hélice du peptide. On retrouve des contacts moyens  $d_{\alpha N(i,i+1)}$  à l'extrémité N-terminale du peptide ainsi que de nombreux contacts faibles  $d_{\alpha\beta(i,i+3)}$  et  $d_{\alpha N(i,i+4)}$ , confirmant le repliement en hélice  $\alpha$  de la région 166-175 du peptide. En revanche, la présence de contacts  $d_{NN(i,i+2)}$  forts au niveau des résidus 10 à 15 semble indiquer une moindre structuration en hélice de la partie C-terminale du peptide.

La présence d'une cystéine supplémentaire dans le peptide analysé par RMN ne doit pas entraîner de conséquences importantes sur la structure secondaire du peptide. En effet, ce résidu est situé en position C-terminale du peptide. De plus, le pH acide (pH 4) de l'échantillon RMN doit maintenir réduite la fonction thiol de la cystéine, empêchant ainsi la formation de ponts disulfures intermoléculaires et donc une dimérisation du peptide.

Les résultats obtenus en RMN et ceux obtenus par dichroïsme circulaire vont dans le même sens. En effet, les mesures en dichroïsme circulaire indiquaient un pourcentage d' $\alpha$ -hélicité de 40% pour le peptide apoA-I [166-183] libre en solution. Ce résultat est confirmé par le spectre NOESY (**Figure 29**). La RMN apporte cependant des indications supplémentaires puisque l'étude NOESY permet d'attribuer avec certitude la structuration hélicoïdale importante de toute la partie N-terminale du peptide.

### 6.9. Orientation des hélices au sein des HDL reconstituées

La spectroscopie infrarouge ATR (*Attenuated Total Reflection*) est une variante de la spectroscopie infrarouge classique qui permet de déterminer l'orientation de peptides ou de protéines insérés dans une bicouche lipidique. Ces mesures ont été réalisées dans le laboratoire du professeur Ruyschaert de l'université libre de Bruxelles (Belgique).

Les HDL reconstituées ont été déposées en solution sur une plaque de Germanium et séchées par un flux d'azote. Un rayon incident à 45° de lumière (IR) polarisée a ensuite été envoyé sur la plaque de Germanium et les spectres ont été enregistrés à 0° et 90° par rapport à l'orientation du rayon incident au moyen d'un spectromètre infrarouge Perkin-Elmer 983 G (15 spectres par échantillon). Le rapport dichroïque est défini par l'équation 5:

$$R_{ATR} = \frac{A_{90^\circ}}{A_{0^\circ}} \quad (5)$$

où  $A_{90^\circ}$  et  $A_{0^\circ}$  sont les absorbances relevées sous lumière incidente polarisée à  $90^\circ$  et  $0^\circ$  respectivement. Ce rapport dépend de l'angle  $\Theta$  formé entre le moment dipolaire de la liaison carbonyle et la normale au cristal de Germanium. Grâce à des tables, il est possible de déterminer la valeur de  $\Theta$  en fonction du rapport dichroïque  $R_{ATR}$ . Dans une hélice  $\alpha$ , le moment dipolaire de la liaison carbonyle de toutes les liaisons amides forme un angle de  $27^\circ$  avec l'axe longitudinal de l'hélice. Il est donc possible de déterminer l'orientation moyenne des hélices à partir de l'orientation du moment dipolaire de cette liaison carbonyle. Le même principe peut être appliqué pour déterminer l'orientation des fonctions carbonyles des phospholipides par rapport à la normale au cristal de Germanium. En combinant ces deux mesures, l'angle formé entre les hélices des peptides et les chaînes alkyles des phospholipides au sein des HDL reconstituées peut donc être obtenu par simple calcul.

Le spectre ATR infrarouge obtenu avec les HDL reconstituées avec le peptide apoA-I [145-183] a permis d'obtenir un rapport dichroïque qui indique que les chaînes hydrocarbonées des phospholipides forment un angle de  $14^\circ$  avec la normale au cristal de Germanium. La bande correspondant à la région amide possédant un minimum de transmission à  $1657\text{ cm}^{-1}$ , est orientée à  $27^\circ$  par rapport à la normale du cristal. On peut donc déduire de cette étude spectroscopique qu'au sein des complexes DMPC/apoA-I [145-183], les axes des hélices  $\alpha$  du peptide sont orientés presque parallèlement à l'axe des particules discoïdales. Les hélices du peptide 145-183 de l'apoA-I humaine et celle de l'apoA-I humaine se positionnent donc de façon équivalente dans les HDL reconstituées discoïdales<sup>134</sup>.

## 7. DISCUSSION

L'utilisation des peptides synthétiques apoA-I [166-183], [161-183] et [145-183] a permis l'exploration du rôle des divers éléments de structure secondaire du domaine 145-183 de l'apolipoprotéine A-I humaine dans l'interaction avec les lipides.

D'un point de vue structural, la modélisation moléculaire a permis de déterminer que l'unité de répétition 145-183 de l'apoA-I humaine se compose potentiellement de deux hélices amphipathiques (résidus 145-162 et 167-183), probablement séparées par une zone courte (résidus 163-166) en conformation étendue de type brin- $\beta$  ou par un coude- $\beta$ . La représentation de Schiffer-Edmunson et la modélisation moléculaire par le calcul des MHP (*molecular hydrophobic potential*) démontre la capacité importante des 2 hélices de cette unité de répétition à se positionner au niveau d'une interface lipide/eau. D'autre part, l'établissement d'interactions électrostatiques intramoléculaires entre les résidus chargés de chaque hélice apparaît possible en regard de la structure modélisée du peptide apoA-I [145-183]. Ces interactions, si elles existent, pourraient jouer un rôle au niveau de la stabilisation de la structure, de l'orientation des faces

hydrophobes des 2 hélices et, en conséquence, au niveau de l'interaction d'un tel motif avec les lipides.

Chaque peptide a donc été synthétisé en phase solide sur un support insoluble de type p-méthylbenzhydridamine (MBHA) afin d'obtenir une fonction carboxamide au niveau de l'extrémité C-terminale des 3 molécules après clivage du support. De même, une acétylation systématique au niveau de l'extrémité N-terminale de chaque peptide a été menée. Le blocage des extrémités a été réalisé dans le but d'éviter toute ionisation défavorable dans le repliement hélicoïdal des chaînes peptidiques (l'extrémité C-terminale chargée négativement et la N-terminale positivement, s'opposeraient à la formation des macrodipôles induits par les deux hélices). L'importance de ce type de blocage pour l'association des peptides aux lipides a été soulignée par Venkatachalapathi et coll.<sup>258</sup>. Ces auteurs observent une association supérieure avec les phospholipides lorsque les extrémités terminales du peptide 18A sont bloquées par rapport au même peptide dont les extrémités sont laissées libres. Enfin, ces modifications chimiques des extrémités des peptides permettent de se rapprocher des conditions natives puisqu'au sein de l'apoA-I totale, ces extrémités sont bloquées par les acides aminés adjacents.

Du point de vue de la structure secondaire, les résultats de dichroïsme circulaire obtenus avec les trois peptides sont en accord avec les prédictions structurales des séquences concernées. Le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité de chaque peptide, compris entre 30 et 40% en solution, dépasse 50% après addition de trifluoroéthanol (TFE). Ces résultats sont en accord avec ceux de Fukushima et coll.<sup>124</sup> qui observent une  $\alpha$ -hélicité de 60% dans une solution de TFE 50% dans l'eau pour une autre unité de répétition 39-mer (121-164) de l'apolipoprotéine A-I humaine (56% pour l'apoA-I [145-183]). Le TFE est un solvant dont la constante diélectrique est inférieure à celle de l'eau et qui est décrit comme possédant la capacité d'optimiser la structuration hélicoïdale des peptides ou des protéines en solution. Il agirait sur l' $\alpha$ -hélicité en privilégiant la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires au dépend de celles formées avec l'eau<sup>259</sup>. Selon d'autres auteurs, le TFE agirait également en perturbant les liaisons faibles intervenant dans les structures tertiaires et quaternaires des peptides ou protéines<sup>260</sup>. Fukushima et coll.<sup>124</sup> proposent que les mesures de dichroïsme dans ce solvant reflètent fidèlement les capacités de structuration hélicoïdale des peptides. Il convient néanmoins d'être prudent sur ce point car l'induction de structures secondaires non natives par le TFE a déjà été mise en évidence. En particulier, Bianco et coll. montrent que la structure de type feuillet- $\beta$ <sup>261</sup> du fragment 12-26 de la Tendamistat est modifiée et apparaît sous la forme d'une hélice  $\alpha$  dans le TFE<sup>262</sup>. Toutefois, de tels réarrangements de structure ne semblent pas se produire pour les apolipoprotéines échangeables, et en particulier pour l'apoA-I. Leroy et Jonas<sup>149</sup> ont récemment démontré qu'un autre alcool de polarité et de constante diélectrique inférieures à celles de l'eau, le n-propanol, induit une conformation native très proche de celle que l'on retrouve lorsque l'apoA-I est liée aux lipides. On peut donc raisonnablement penser

que l'addition de TFE provoque bien une structuration en hélice  $\alpha$  des 3 peptides, comparable à celle observée lors de l'association aux lipides. Nos mesures d' $\alpha$ -hélicité du peptide apoA-I [145-183] réalisées sur les HDL reconstituées avec ce peptide et le DMPC, sont en accord avec cette hypothèse. En effet, la proportion d' $\alpha$ -hélicité atteint 59% dans les HDL reconstituées et 56% dans le mélange TFE/tampon phosphate (1/1 en volume).

L'étude RMN a permis de préciser plus finement la structure du peptide apoA-I [166-183] en solution aqueuse. L'étude des contacts NOE met clairement en évidence une structuration en hélice  $\alpha$  de la partie N-terminale du peptide dans l'eau. La structuration hélicoïdale du côté C-terminal, en revanche, apparaît moins évidente. Bien que les études RMN et de dichroïsme circulaire aient été réalisées à des pH différents, on peut émettre l'hypothèse que l'addition de TFE entraîne le repliement en hélice de l'extrémité C-terminale du peptide, le pourcentage total d' $\alpha$ -hélicité atteignant dans ces conditions une valeur supérieure à 50%.

L'étude de l'association réversible des peptides apoA-I [166-183] et [145-183] avec des vésicules de EggPC montre que les constantes de dissociation de ces deux peptides sont semblables (respectivement  $11,9 \pm 1,3$  et  $13,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ). Ces résultats montrent que ces peptides, de 18 et 39 acides aminés respectivement, possèdent une affinité similaire pour les lipides. Toutefois, la capacité d'association aux phospholipides maximale du peptide apoA-I [145-183] est 3,5 fois plus importante que celle observée pour le peptide apoA-I [166-183]. Les résultats relatifs au plus long peptide sont en accord avec ceux obtenus par Fukushima et coll.<sup>124</sup> sur l'unité structurale de répétition 121-165 de l'apoA-I humaine. Néanmoins, ces auteurs ne montrent pas de différence significative entre la capacité d'association maximale aux phospholipides des peptides 144-165 (22 acides aminés) et 121-165 (35 acides aminés). Au delà des différences de séquences, ces divergences dans les résultats peuvent être attribuées aux méthodes expérimentales utilisées pour l'étude de l'association réversible lipides/peptide. Dans notre étude, les peptides libres ont été séparés des peptides associés aux vésicules de EggPC par HPLC sur une colonne TSK. En revanche, les auteurs précités ont réalisé cette séparation sur un système FPLC équipé d'une colonne Sephadex 200. La différence de pression et de durée de séparation, ou encore des phénomènes d'agrégation sur la phase chromatographique ont pu influencer la stabilité des complexes formés avec le peptide le plus court.

A la différence des expériences d'association réversible, la reconstitution de HDL discoïdales fait intervenir la transformation de petites vésicules unilamellaires sphériques (SUV) de phospholipides en une bicouche discoïdale, semblable aux HDL natives retrouvées *in vivo*. Pour induire cette transformation micellaire, deux conditions sont nécessaires :

- 1) un passage par la température de transition du phospholipide afin de permettre la réorganisation micellaire

2) les SUV doivent être mises en présence d'un agent présentant une amphipaticité suffisante pour permettre de masquer l'hydrophobicité des chaînes alkyles exposées au solvant aqueux dans la structure discoïdale.

Les différences de stabilité des complexes formés avec les 3 peptides, observées lors des expériences d'association réversible, étaient encore plus évidentes lors des essais de reconstitution d'HDL discoïdales. Les complexes DMPC/peptide apoA-I [166-183] et [161-183] se dissocient totalement sur la colonne de gel filtration pendant l'étape de purification. Les complexes générés avec le peptide apoA-I [145-183] ne se dissocient pas dans ces mêmes conditions et apparaissent donc plus stables. Toutefois, la stabilité des complexes DMPC/A-I [145-183] qui est optimale aux alentours de la température de transition du phospholipide, décroît sensiblement en dehors de cette étroite gamme de température, comme le montrent les expériences de turbidité. La calorimétrie confirme également la faible stabilité des complexes générés avec le peptide apoA-I [145-183]. Néanmoins, des complexes générés avec le DMPC ou le DPPC et le peptide apoA-I [145-183] ont pu être purifiés, et une analyse physico-chimique approfondie de ces complexes a ainsi pu être menée.

A notre connaissance, cette étude est la seule qui propose la préparation et la caractérisation de HDL reconstituées avec des peptides dérivés de l'apoA-I de cette taille. Les photographies de microscopie électronique révèlent bien le caractère discoïdal des HDL reconstituées avec le peptide apoA-I [145-183]. Cependant, le diamètre des complexes générés avec ce peptide est 2 fois plus important que le diamètre de ceux obtenus avec l'apoA-I native. Le nombre de phospholipides par hélice  $\alpha$  est respectivement de 15 et 50 pour les HDL reconstituées avec l'apoA-I native et le peptide. Ceci suggère un manque de stabilisation lipidique par le peptide. Ce déséquilibre est confirmé par les mesures de polarisation de fluorescence à l'aide du DPH qui montrent que l'association avec le peptide affecte de façon moins importante la mobilité des chaînes alkyles des lipides dans les complexes, que l'association avec l'apoA-I native. Les complexes générés avec le peptide apoA-I [145-183] semblent donc présenter une stabilité moindre que ceux générés avec l'apoA-I native.

Comment expliquer la stabilité supérieure des complexes générés avec le peptide apoA-I [145-183] par rapport à celle des complexes obtenus avec les peptides apoA-I [161-183] ou [166-183]? Une hypothèse est l'existence d'une coopérativité hélice/hélice lors de l'association des hélices amphipathiques avec les lipides. Cette coopérativité, déjà évoquée par Fukushima et coll.<sup>124</sup>, a été confirmée récemment par Anantharamaiah et coll.<sup>263</sup> qui montrent que la ligation covalente de deux peptides synthétiques amphipathiques (18A) par l'intermédiaire d'une proline (18A-Pro-18A) augmente la stabilité des complexes formés par rapport à ceux générés avec le peptide 18A seul. Ils suggèrent que l'interaction issue de la coopérativité entre les domaines amphipathiques de 2 hélices liées entre elles par une proline, mime plus finement l'association

phospholipides/apolipoprotéine que 2 hélices non liées. Par ailleurs, les données acquises par la modélisation du segment 145-183 de l'apoA-I montrent que la composante électrostatique de l'énergie d'interaction s'exerçant entre les 2 hélices est largement majoritaire par rapport aux autres forces mises en jeu (Van der Waals, interactions hydrophobes). La structure hélice-(brin- $\beta$ /coude- $\beta$ )-hélice du motif 145-183 pourrait donc être fortement influencée par l'établissement d'interactions électrostatiques entre les 2 hélices adjacentes par l'intermédiaire de résidus de charges opposées. De telles interactions ont déjà été mises en évidence dans des HDL reconstituées avec l'apoA-I et l'apoA-IV<sup>135.136.141</sup>. Ce même type d'interaction est également visible sur le modèle de structure cristalline de l'apo E<sup>116</sup>. Il est très probable que ces interactions électrostatiques jouent un rôle important dans la coopérativité des hélices lors de l'association apolipoprotéine/lipides et puissent en partie expliquer la stabilité supérieure des complexes générés avec le peptide apoA-I [145-183] qui sont eux mêmes moins stables que ceux obtenus avec l'apolipoprotéine native.

## 8. CONCLUSION

Le peptide de 39 acides aminés, correspondant à la séquence 145-183 de l'apolipoprotéine A-I, constitue vraisemblablement une unité fonctionnelle stable de l'apolipoprotéine A-I. En effet, cette unité représente un motif structural minimal permettant la reconstitution *in vitro* de HDL discoïdales en présence de phospholipides. Cependant, les analyses de stabilité et les caractéristiques physico-chimiques des complexes formés avec ce peptide montrent que ces HDL reconstituées sont très différentes et surtout beaucoup moins stables que celles générées avec l'apolipoprotéine A-I native. L'effet de coopérativité permettant d'obtenir une interaction stable des hélices amphipathiques avec les phospholipides est maximal dans la protéine native, mais ne semble pas être suffisant au sein du motif 145-183 pris isolément. La reconstitution de HDL discoïdales synthétiques, composées d'une unité de répétition isolée de l'apolipoprotéine A-I et possédant des propriétés physico-chimiques et une stabilité comparables aux LpA-I reconstituées, ne peut donc pas être mis en oeuvre avec le peptide apoA-I [145-183], ni sans doute avec tout autre peptide de même longueur issu de cette apolipoprotéine.

## 9. PUBLICATION

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Journal of Lipid Research*. La référence complète de cet article est :

Vanloo B., Demoor L., Boutillon C., Lins. L. Baert J., Fruchart J.C., Tartar A. & Rosseneu M., (1995). Association of synthetic peptide fragments of human apolipoprotein A-I with phospholipids. *J. Lipid Res.*, 36, 1686-1696.

## CHAPITRE IV. ETUDE DE PEPTIDES DENDRIMERIQUES ISSUS DE LA POLYMERISATION DE FRAGMENTS D'APOA-I HUMAINE.

### 1. INTRODUCTION

L'utilisation de peptides synthétiques simples, correspondant à des séquences courtes d'apolipoprotéine A-I, ne permet pas la reconstitution d'HDL discoïdales stables possédant des caractéristiques physico-chimiques comparables à celles des particules générées avec l'apoA-I entière. Le chapitre précédent montre, en effet que, même si le motif structural de répétition hélice-coude-hélice (ou hélice-brin- $\beta$ -hélice mais pour des raisons de commodité, nous utiliserons la première dénomination dans le reste du texte) représente le motif minimal nécessaire pour induire la formation de particules discoïdales, l'interaction de ce motif avec les lipides reste insuffisante pour garantir une stabilité importante des complexes générés. L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'incapacité du motif hélice-coude-hélice à produire des HDL discoïdales est le manque de coopérativité entre les hélices dans le modèle synthétique simple. Au niveau de l'apoA-I native, la coopérativité entre les unités structurales est basée sur l'association en tandem des hélices consécutives dans la séquence linéaire<sup>140</sup>. Cette coopérativité est donc réduite dans un modèle à 2 hélices.

La synthèse peptidique en phase solide permet aujourd'hui la conception de peptides de grande taille reproduisant la succession linéaire de plusieurs copies d'un motif peptidique. Cependant, ces synthèses sont encore difficilement maîtrisées et sont lourdes à mettre en oeuvre tant au niveau de la durée de synthèse qu'au niveau des procédés de purification mis en jeu. Toutefois, à la différence de la biosynthèse, la voie de synthèse chimique permet d'accéder facilement à des molécules branchées pour lesquelles plusieurs séquences sont synthétisées simultanément sur la base d'un support fonctionnalisé. Une telle approche a été proposée par Tam et coll.<sup>264</sup> avec la construction de type MAP (*Multiple antigen peptide*). Celle-ci s'est avérée très efficace pour augmenter l'immunogénicité de petits peptides intrinsèquement faiblement immuno-réactifs<sup>265</sup>. Les MAP se présentent sous la forme de dendrimères peptidiques et sont obtenus par l'utilisation d'une matrice arborescente, constituée de résidus de lysines, permettant la synthèse simultanée de peptides synthétiques branchés. Selon le nombre de résidus de lysine utilisés pour la construction de la matrice, de 2 (1 lysine) à 32 peptides (31 lysines) peuvent être simultanément synthétisés sur la matrice. Nous avons décidé d'étendre ce concept au domaine des apolipoprotéines échangeables afin de permettre l'induction d'un effet de coopérativité par l'association parallèle de plusieurs copies d'une même unité structurale. Ce type de construction autorise, de plus, l'ajustement du nombre d'unités structurales incluses dans la molécule, afin de mimer le plus finement possible l'apolipoprotéine A-I native associée aux lipides.

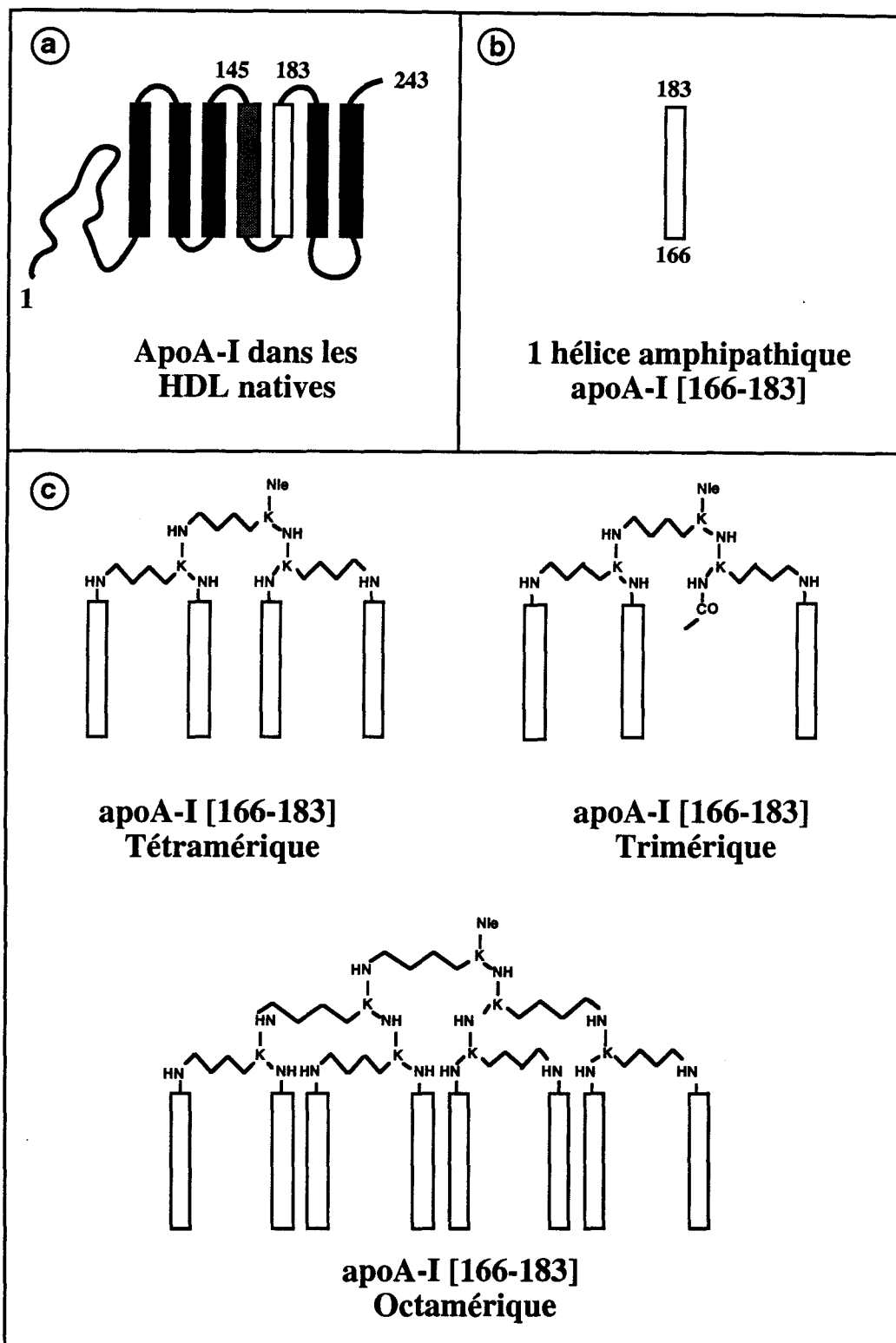


Figure 31. Représentation schématique (a) des unités de répétition de l'apoA-I lorsqu'elle est associée aux phospholipides dans les HDL discoïdales, (b) du peptide apoA-I [166-183] seul ou (c) de la séquence 166-183 de l'apoA-I incluse dans une structure trimérique, tétramérique ou octamérique branchée.



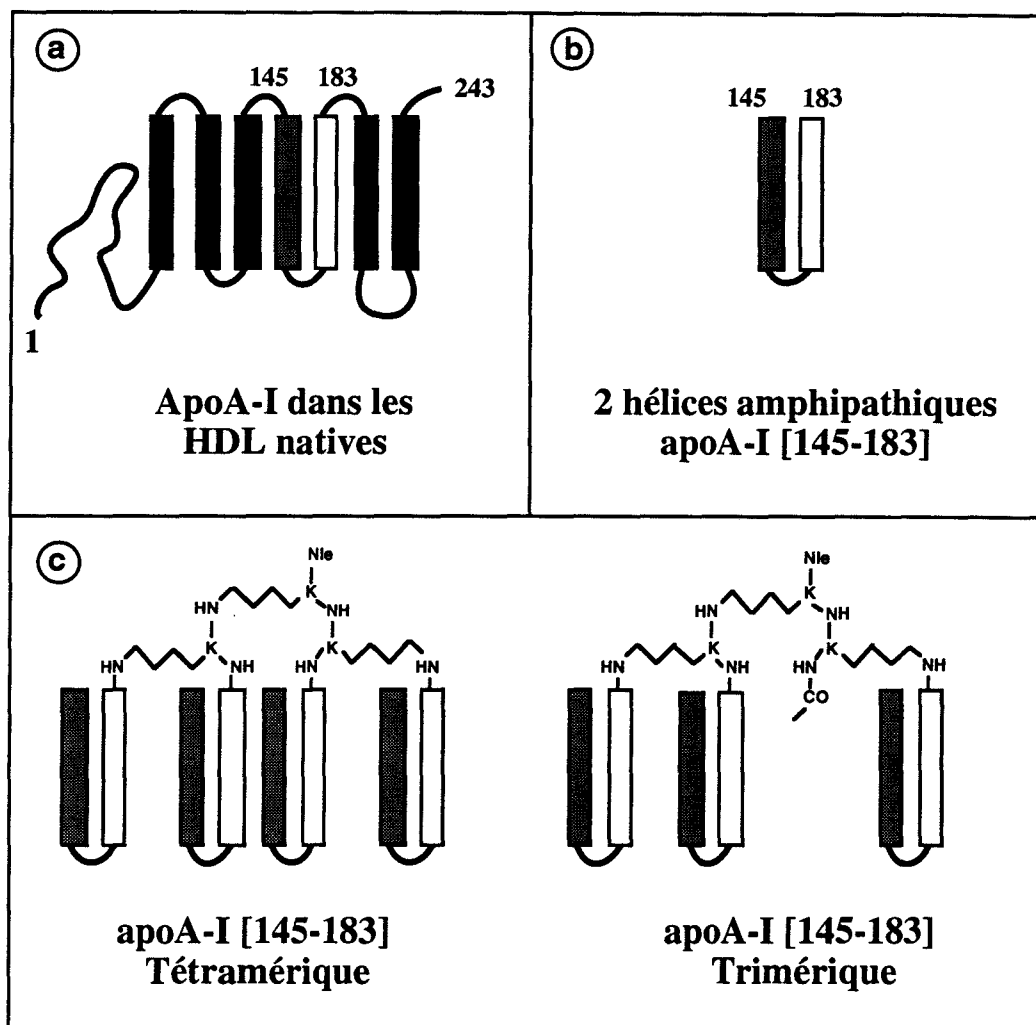


Figure 32. Représentation schématique des unités de répétition de l'apoA-I lorsqu'elle est associée aux phospholipides dans les HDL discoïdales (a), du peptide apoA-I [145-183] seul (b) ou de la séquence 145-183 de l'apoA-I incluse dans une structure trimérique ou tétramérique branchée (c).

## 2. CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES PEPTIDES DENDRIMÉRIQUES

### 2.1. Conception

Des études antérieures portant sur la reconstitution d'HDL avec des phospholipides et l'apoA-I native (voir chap. II.2.2.1) ont montré que différentes classes de complexes peuvent être générées suivant le rapport initial lipides/protéine utilisé<sup>151.157</sup>. Ces différentes classes de complexes diffèrent par le nombre de molécules d'apoA-I impliquées dans chaque complexe. Au sein même de ces différentes classes, une autre hétérogénéité de taille peut être observée. Elle a été attribuée à la flexibilité conformationnelle de l'apolipoprotéine A-I qui serait capable de

recruter un nombre variable d'hélices (6,7 ou 8) dans la liaison avec les phospholipides à la périphérie des particules discoïdales<sup>266</sup>. En conséquence, nous avons décidé de synthétiser deux constructions principales, l'une trimérique et l'autre tétramérique, constituées respectivement de 3 et 4 copies de la séquence apoA-I [145-183] (6 et 8 hélices théoriques) par molécule. Des constructions de même type ont également été synthétisées avec la séquence apoA-I [166-183] (3 et 4 hélices). Enfin, une construction octamérique a été synthétisée à partir de la séquence 166-183 de l'apoA-I (8 hélices). Ces diverses constructions sont représentées schématiquement sur les **figures 31 et 32**.

## 2.2.Synthèses des supports arborescents

### 2.2.1.Synthèse de la résine tétramérique

Le support tétramérique (**figure 33**) a été synthétisé à partir de 0,77 mmole de résine MBHA. Afin d'éviter un encombrement stérique excessif de la résine lors de la croissance des molécules de peptides tétramériques, une étape de décharge de la résine a été menée au préalable par couplage de 0,2 mmole (0,26 équivalent) de norleucine sur la MBHA. Ainsi, après neutralisation des fonctions  $\text{NH}_2$  de la résine MBHA par de la DIEA 5% (en volume) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , la norleucine (Nle) a été couplée à l'aide de 0,2 mmole (0,26 équivalent) de N-t-Boc-Nle, 0,2 mmole de BOP (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-diméthylamino-phosphonium-hexafluorophosphate) comme agent de couplage, 0,2 mmole d'HOBT et 0,6 mmole de DIEA (0,78 équivalent) dans le DMF (diméthylformamide) pendant 45 minutes. Ce couplage a été suivi d'une acétylation (*capping*) des fonctions  $\text{NH}_2$  résiduelles par l'anhydride acétique 10%, DIEA 5% (en volume) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pendant 10 minutes, ainsi que d'un clivage des groupements t-Boc par du TFA 50% (en volume) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pendant 16 minutes. Un test quantitatif à la ninhydrine<sup>267</sup> a permis de mesurer une charge de 0,23 mmole de fonctions  $\text{NH}_2$  par gramme de résine après déprotection. Le premier rang de lysine a été synthétisé en utilisant 0,46 mmole (2 équivalents) de N- $\alpha,\epsilon$ -di-t-Boc-Lys, 0,46 mmole de BOP, 0,46 mmole d'HOBT, et 1,38 mmoles (6 équivalents) de DIEA dans le DMF pendant 45 min. Après *capping* et clivage des groupements t-Boc, le second rang de lysine a été synthétisé en utilisant 0,92 mmoles (2 équivalents) de N- $\alpha,\epsilon$ -di-t-Boc-Lys, 0,92 mmole de BOP, 0,92 mmole d'HOBT, et 2,76 mmoles (6 équivalents) de DIEA dans le DMF pendant 45 minutes. Après *capping* et clivage des groupements t-Boc, la résine tétramérique était prête à être utilisée comme une résine classique pour une synthèse peptidique en phase solide. Toutes les étapes de couplage et de déprotection de cette synthèse ont été contrôlées par des tests qualitatifs à la ninhydrine<sup>268</sup> permettant de révéler l'absence ou la présence de fonctions  $\text{NH}_2$  libres sur la résine.

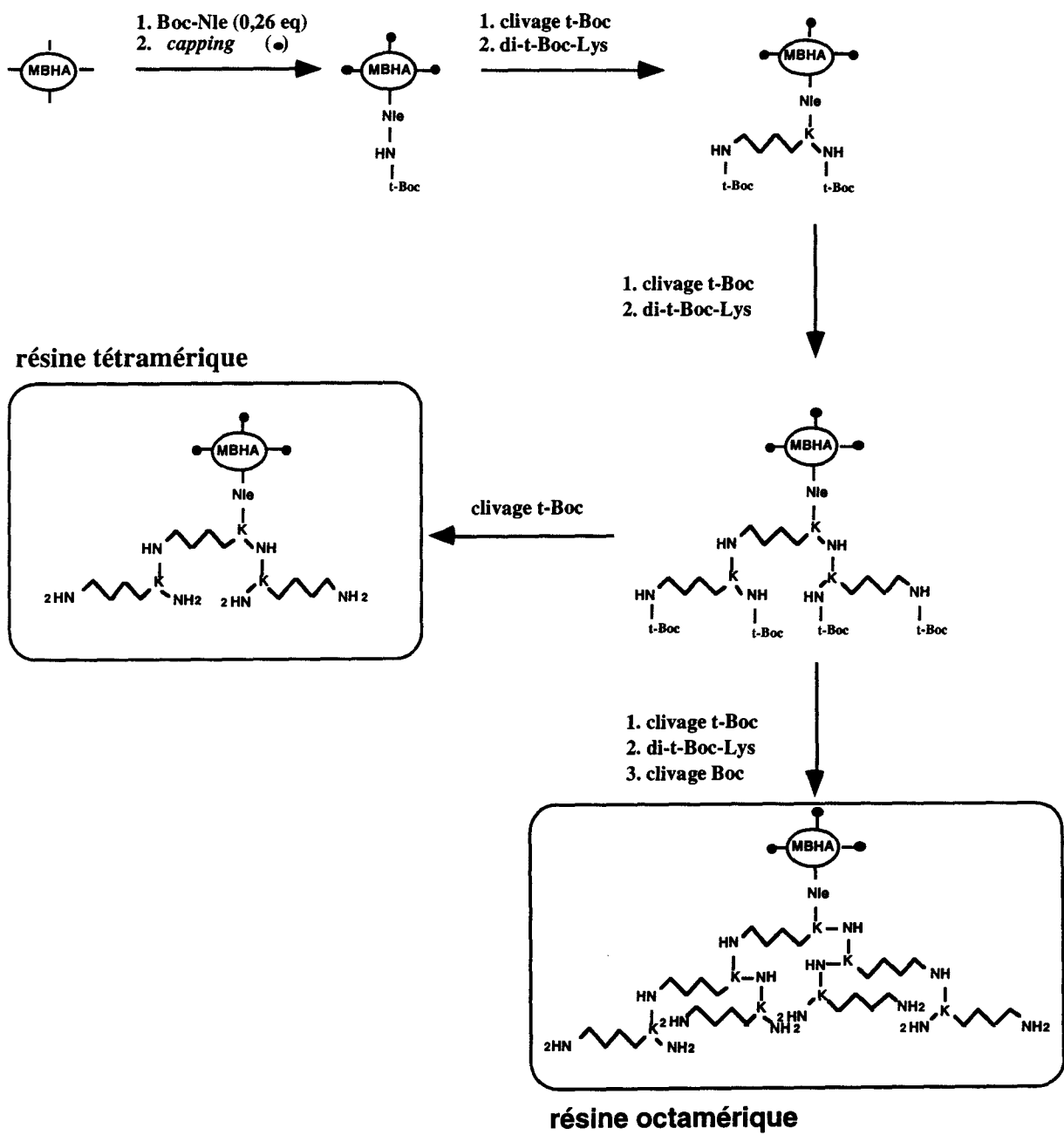


Figure 33. Stratégies de synthèse des résines tétramérique et octamérique.

### 2.2.2. Synthèse de la résine octamérique

Une fraction correspondant à la moitié de la résine tétramérique précédemment synthétisée a été utilisée pour la synthèse du support octamérique (**figure 33**). Un troisième rang de lysine a été synthétisé à l'aide de 0,92 mmole (2 équivalents) de N- $\alpha,\epsilon$ -di-t-Boc-Lys, 0,92 mmole de BOP, 0,92 mmole d'HOBT, et 2,76 mmoles (6 équivalents) de DIEA dans le DMF pendant 45 minutes. Après *capping* et clivage des groupements t-Boc, la résine octamérique était prête à être utilisée comme une résine classique pour une synthèse peptidique en phase solide (donnant naissance à des peptides octamériques).

### 2.2.3. Synthèse de la résine trimérique

La synthèse de la matrice trimérique (**figure 34**) a également été conduite en phase solide à partir de 0,77 mmole de résine MBHA. Toujours dans le but d'éviter un encombrement stérique de la résine lors de la croissance du peptide trimérique, une étape de décharge de la résine a été menée par couplage de 0,27 mmole (0,35 équivalent) de Norleucine sur la MBHA. Ainsi, après neutralisation des fonctions NH<sub>2</sub> de la résine MBHA par de la DIEA 5% (en volume) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la norleucine a été couplée à l'aide de 0,27 mmole (0,35 équivalent) de N-t-Boc-Nle, 0,27 mmole de BOP (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-diméthylamino-phosphonium-hexafluorophosphate), 0,27 mmole d'HOBT et 0,81 mmole de DIEA (0,78 équivalent) dans le DMF, pendant 45 minutes. Ce couplage a été suivi d'une acétylation (*capping*) des fonctions NH<sub>2</sub> libres par l'anhydride acétique 10%, DIEA 5% (en volume) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 10 minutes, ainsi que d'un clivage des groupements t-Boc par le TFA 50% (en volume) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 16 minutes. Un test quantitatif à la ninhydrine<sup>267</sup> a permis de mesurer une charge de 0,28 mmole de fonctions NH<sub>2</sub> par gramme de résine après déprotection. Le premier rang de lysine a été synthétisé en utilisant 0,56 mmole (2 équivalent) de N- $\alpha$ -Fmoc- $\epsilon$ -t-Boc-Lys, 0,56 mmole de BOP, 0,56 mmole d'HOBT, et 1,68 mmoles (6 équivalents) de DIEA dans le DMF pendant 45 minutes. Après *capping* et élimination de la protection t-Boc, la première partie du second rang de lysine a été synthétisée en utilisant 0,56 mmole (2 équivalents) de N- $\alpha,\epsilon$ -di-t-Boc-Lys, 0,56 mmole de BOP, 0,56 mmole d'HOBT, et 1,68 mmoles (6 équivalents) de DIEA dans le DMF pendant 45 minutes. La protection Fmoc du premier rang a alors été clivée par la piperidine 20% (en volume) dans le DMF pendant 20 minutes. La seconde partie du second rang de lysine a ensuite été synthétisée en utilisant 0,56 mmole (2 équivalents) de N- $\alpha$ -Fmoc- $\epsilon$ -t-Boc-Lys, 0,56 mmole de BOP, 0,56 mmole d'HOBT, et 1,68 mmoles (6 équivalents) de DIEA dans le DMF pendant 45 minutes. La dernière protection Fmoc a été clivée et les fonctions NH<sub>2</sub> résultantes acétylées. La déprotection des trois groupements t-Boc restants a permis d'obtenir une résine trimérique, prête à être utilisée comme une résine classique pour une synthèse peptidique en phase solide.

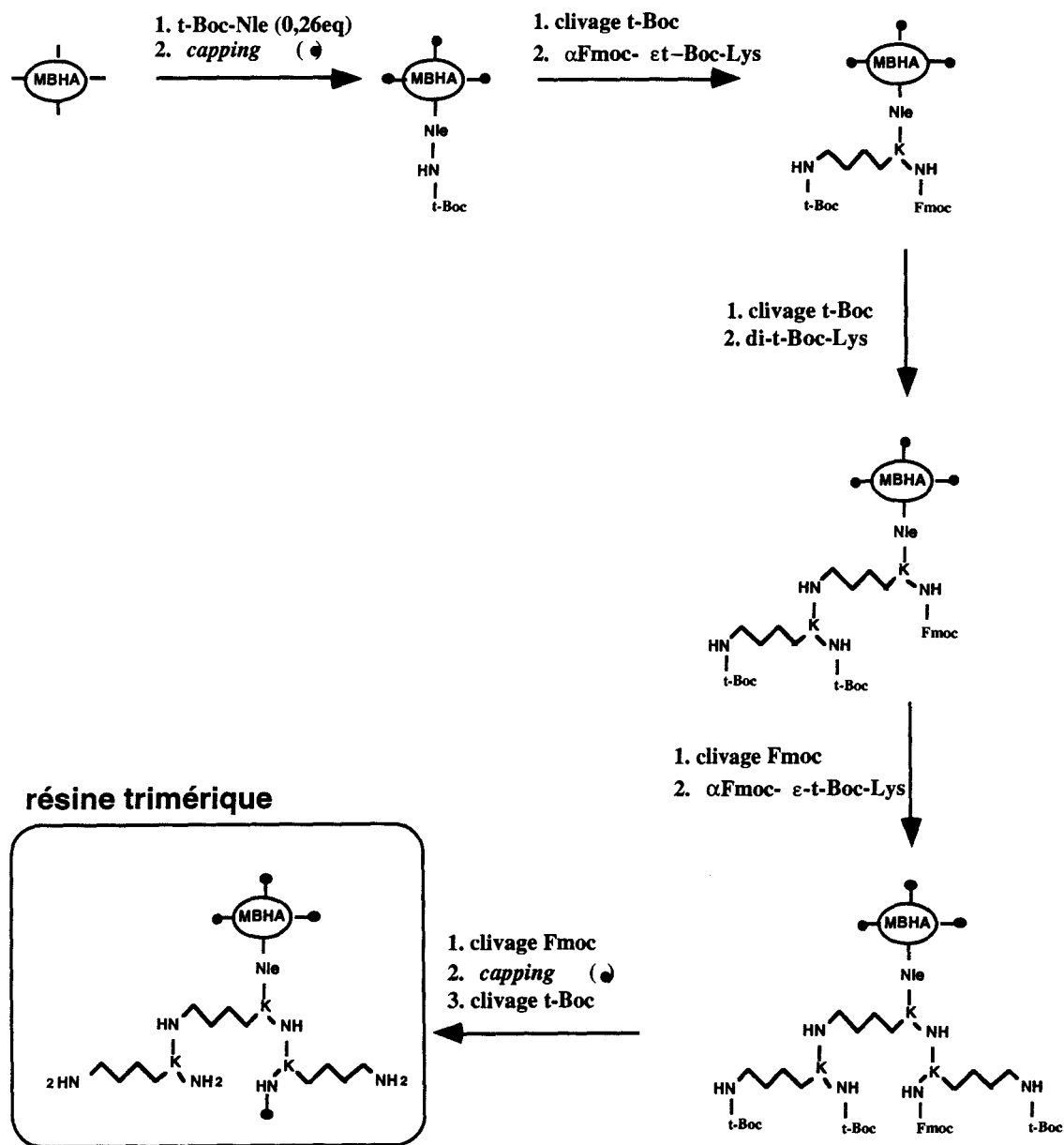


Figure 34. Stratégie de synthèse de la résine trimérique.

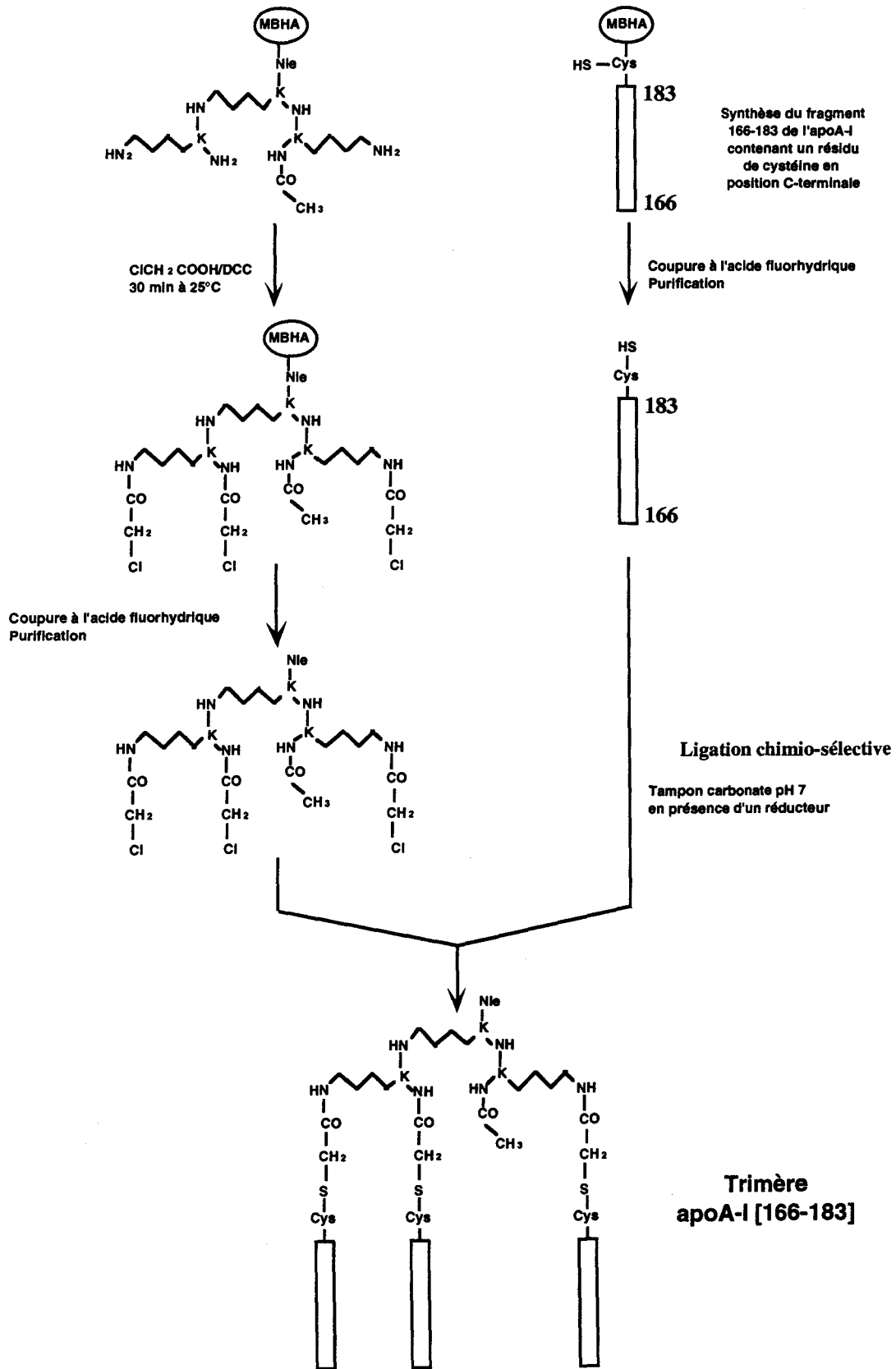


Figure 35. Stratégie de synthèse du trimère apoA-I [166-183] par ligation chimique.

#### 2.2.4. Synthèse du support trimérique chloroacétylé

Afin de synthétiser des constructions caractérisables du point de vue chimique, une stratégie de ligation chimio-sélective a été utilisée en parallèle, pour la synthèse de l'un des peptides dendrimériques (**figure 35**). Celle-ci a consisté à lier sélectivement en milieu homogène, le peptide apoA-I [166-183] pourvu d'une Cys en position C-terminale à une matrice trimérique dont les fonctions  $\text{NH}_2$  des lysines étaient chloroacétylées. Avant de réagir pour former une liaison du type sulfure, ces deux protagonistes ont été préalablement purifiés.

La fonctionnalisation de la matrice trimérique par l'acide chloroacétique a été effectuée dans les conditions suivantes :

- peptidyl-MBHA (1 eq)
- acide chloroacétique (10 eq)
- DCC (5 eq)
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /DMF (2/1 en volume), 30 min à température ambiante

La matrice branchée a ensuite été clivée de son support MBHA par coupure à l'acide fluorhydrique en l'absence de *scavengers*, puis précipitée dans l'éther après extraction au TFA. Pour des raisons de mauvaise résolution en RP-HPLC, le produit brut de coupure HF a été purifié en chromatographie gravitationnelle sur gel de silice 60 (Macherey-Nagel, Allemagne) dans le système éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /n-butanol/acide acétique (1/1/1, en volume). Cette technique a permis d'obtenir 41,5 mg de matrice trimérique activée pure pour 100 mg de brut traité, soit un rendement de purification de 42% en masse. L'homogénéité de la matrice fonctionnalisée a été vérifiée par RP-HPLC sur colonne  $\text{C}_{18}$ . Son identité a été déterminée par spectrométrie de masse PD-MS, donnant une masse mesurée de 786,6 Da (masse théorique : 785,5 Da).

#### 2.3. Synthèse et purification des peptides dendrimériques

Les matrices trimériques et tétramériques, liées de façon covalente à la résine MBHA, ont été utilisées pour la synthèse automatique des peptides apoA-I[145-183] et apoA-I[166-183] à l'aide d'un synthétiseur 430A Applied Biosystems (Foster city, CA). La procédure de couplage chimique utilisée mettait en jeu le 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate<sup>249</sup> (HBTU) et le 1-hydroxy-benzotriazole (HOBT) et était associée à une stratégie de protection de type t-Boc/Benzyl. La matrice octamérique n'a servi qu'à la synthèse du peptide apoA-I[166-183] afin d'obtenir un total de 8 hélices sur la construction finale. La procédure de synthèse mise en jeu pour l'ensemble de ces peptides dendrimériques était

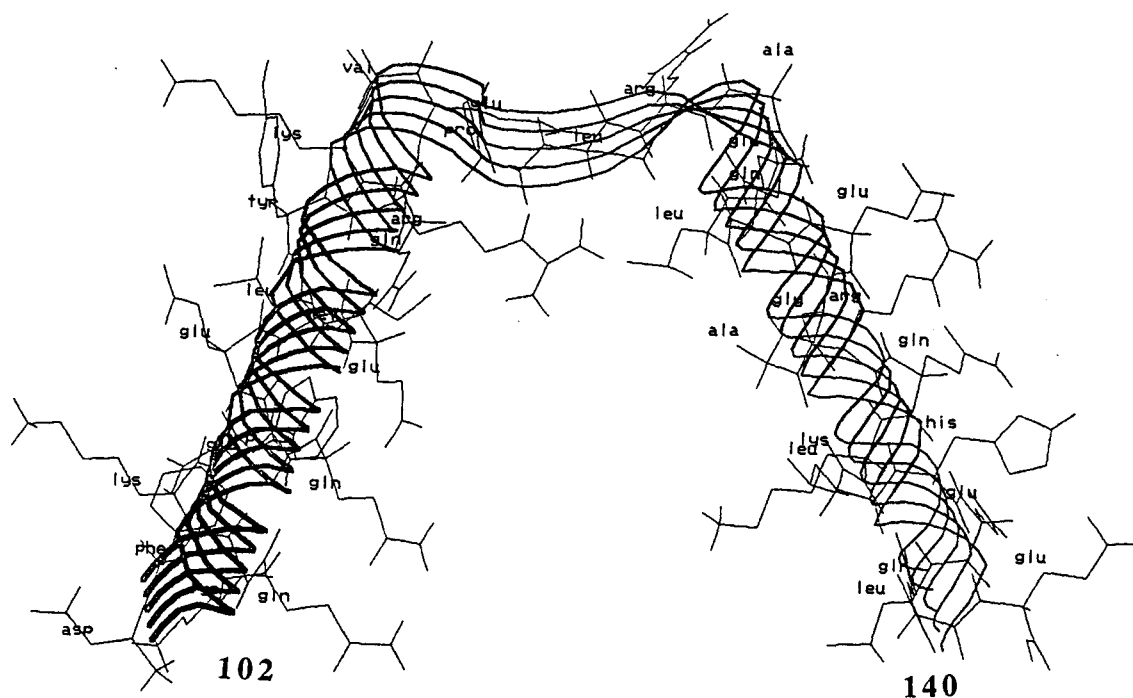
identique à celle menée pour les peptides linéaires apoA-I[145-183] et apoA-I[166-183] qui sont décrites en détail dans le chapitre précédent. Toutefois un excès de 4 (au lieu de 2) en acides aminés a été utilisé pour chaque double couplage et aucune étape de *capping* n'a été mise en œuvre au cours de la synthèse. Cette stratégie a été adoptée afin de s'affranchir au maximum de la présence de chaînes tronquées au sein des constructions dendrimériques. Ainsi, l'apparition de points de délétion dans les chaînes peptidiques (et donc de micro-hétérogénéités moléculaires) a été préférée à la présence de chaînes tronquées en regard des propriétés attendues d'association aux phospholipides de ces molécules.

En ce qui concerne le peptide tétramérique apoA-I [145-183], une synthèse supplémentaire a été réalisée en intercalant un bras espaceur entre la matrice branchée et le peptide, ceci afin de déterminer l'influence de la distance peptide-matrice sur l'association aux lipides. Le bras choisi, l'acide 4-amino butanoïque (ABU), a été couplé manuellement à la suite de la synthèse du deuxième rang de lysines, sous forme protégée par un  $\gamma$ -t-Boc (2 équivalents) au niveau de la fonction amine, en présence de BOP (2 équivalents), HOBt (2 équivalents), et de DIEA (6 équivalents). Après un *capping* et le clivage du t-Boc, la synthèse du peptide apoA-I [145-183] a été menée de façon identique à celle de la construction équivalente, sans bras espaceur.

Un autre peptide tétramérique, construit sur la base de la séquence 102-140 de l'apoA-I (tétramère apoA-I [102-140]), a aussi été synthétisé à partir du même lot de résine tétramérique. Cette séquence, prédite comme étant constituée d'un motif hélice-coude-hélice (**figure 36**), précède le motif hélice-coude-hélice 145-183 de l'apoA-I humaine.

En fin de synthèse, les extrémités N-terminales de chaque construction dendrimérique ont été bloquées par acétylation. L'histidine a ensuite été déprotégée par thiolysse et le clivage du support insoluble ainsi que la déprotection des autres chaînes latérales ont été obtenus par coupure à l'acide fluorhydrique (HF) dans les mêmes conditions que la synthèse des peptides linéaires. Un traitement TFA/éther, suivi d'une redissolution dans l'acide acétique 10% (en volume) et d'une lyophilisation, permet d'obtenir un produit brut de coupure HF. Afin d'éliminer les sous-produits de synthèse et les *scavengers* résiduels, les produits bruts de coupure HF ont été dialysés contre de l'eau ultra-pure au moyen d'une cellule d'ultrafiltration munie d'une membrane cellulosique (seuil : 5000 Da). Après une nouvelle lyophilisation, les peptides ont été analysés en RP-HPLC sur colonne C4 (Vydac, Hesperia, CA, USA). Les profils obtenus sont présentés sur la **figure 37**.

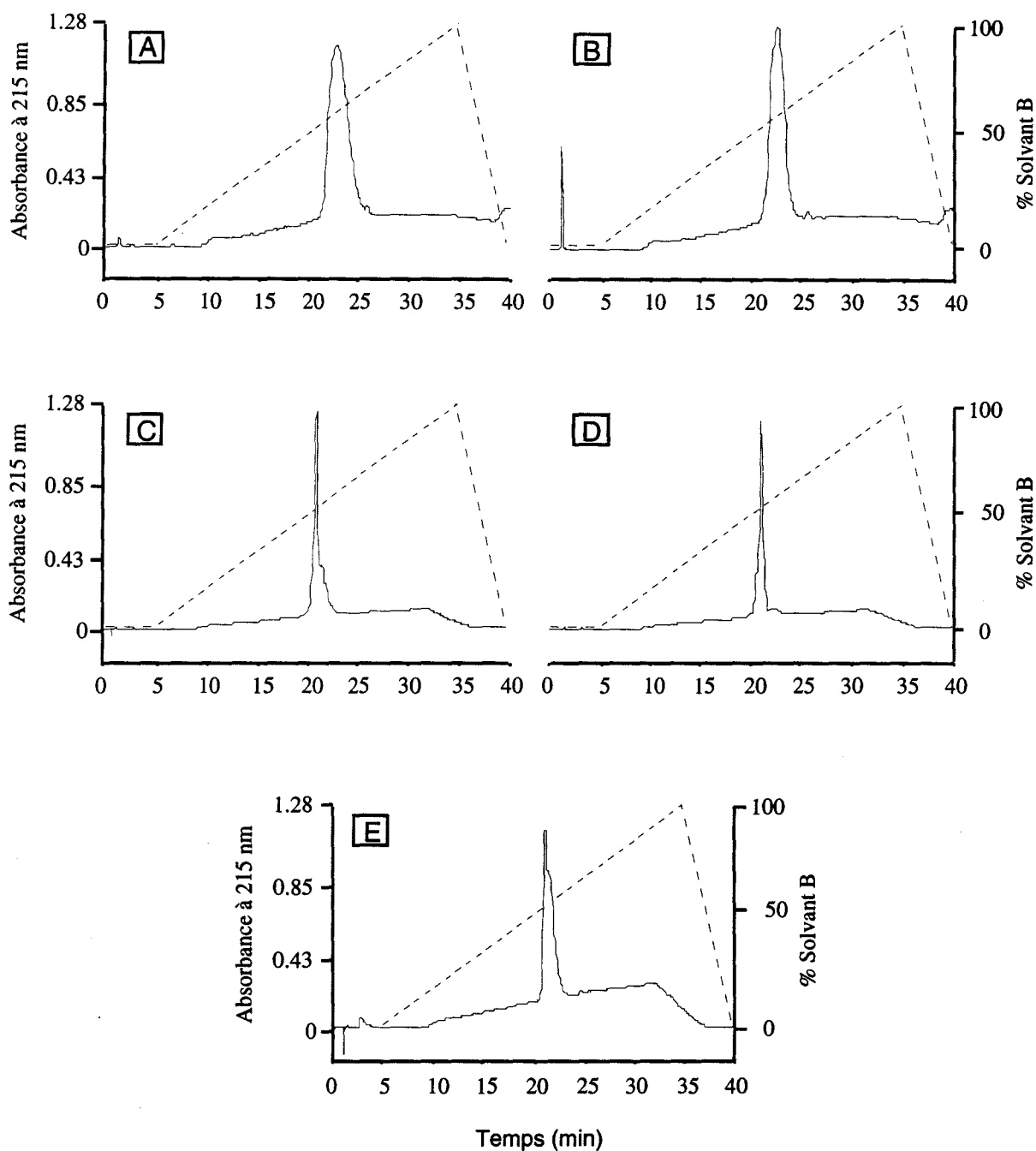




**Figure 36. Modélisation du peptide apoA-I [102-140] par le programme Prot+ développé par R. Brasseur.**

Lors de la préparation du trimère apoA-I [166-183] par ligation chimique, le peptide apoA-I [166-183] comprenant un résidu de Cys supplémentaire en position C-terminale (apoA-I[166-183]-Cys) a été synthétisé à l'aide d'un automate Applied Biosystems 430A (Foster city, CA) à partir de 0,25 mmole de résine MBHA. La procédure de couplage chimique utilisée a mis en jeu le 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate<sup>249</sup> (HBTU) et le 1-hydroxy-benzotriazole (HOBT) associés à une stratégie de protection t-Boc/Benzyl. Les groupements protecteurs des chaînes latérales étaient identiques à ceux utilisés lors de la synthèse des autres peptides, à l'exception de la cystéine qui était protégée par un groupement methyl-benzyl.

Après acétylation de l'extrémité N-terminale, le peptide a été clivé de son support insoluble par coupure à l'acide fluorhydrique (HF) en présence de thiocrésol et de parathiocrésol. Cette étape a été suivie d'une solubilisation du peptide dans le TFA et d'une précipitation dans l'éther éthylique froid. Le produit brut de coupure HF a ensuite été purifié une première fois en RP-HPLC sur colonne C18 puis en IE-HPLC (échange d'ion) sur colonne sulfoéthyl. Ce protocole de purification a permis d'obtenir 42,6 mg de peptide apoA-I [166-183]-Cys pur.



**Figure 37. Profils RP-HPLC des différents peptides dendrimériques synthétisés et dialysés.**

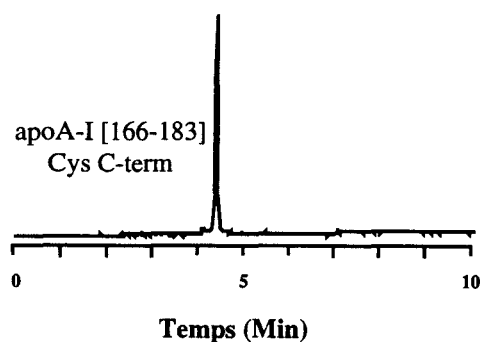
Colonne (1 x 200 mm) avec silice greffée  $C_4$ , 9 nm de porosité pour 10  $\mu$ m de diamètre (Vydac Hesperia, CA, USA), gradient linéaire de 0 à 100% de solvant B en 30 min, débit 1 ml/min, système éluant : solvant A. TFA 0,05% dans  $H_2O$  (en volume); solvant B. TFA 0,05% ,  $CH_3CN$  60% dans  $H_2O$  (en volume).

A et C : tétramères apoA-I [145-183] et [166-183],

B et D : trimère apoA-I [145-183] et [166-183],

E : octamère apoA-I [166-183].

Le profil d'électrophorèse capillaire de ce peptide (**figure 38**) montre un degré de pureté supérieur à 97% compatible avec une caractérisation par RMN.



**Figure 38. Profil électrophorétique du peptide apoA-I [166-183]-Cys purifié en RP-HPLC et IE-HPLC.**

Electrophorèse capillaire Applied Biosystems model 270 A (Foster city, CA), 25 kV de tension appliquée, capillaire en silice de 50 cm de longueur et de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre. La séparation a été effectuée à 30°C dans un tampon citrate de sodium 20 mM à pH 2,5. La détection a été réalisée à 200 nm.

Le couplage chimio-sélectif du peptide linéaire sur la matrice branchée activée (formation d'une liaison sulfure par substitution nucléophile) a été réalisé sous atmosphère inerte (argon) pour empêcher l'oxydation du peptide. Un excès de peptide de 4,5 par rapport à la matrice a été utilisé. La réaction s'est effectuée à pH 7 pendant 24 heures dans un tampon carbonate 0,1M contenant 0,5 équivalent de phosphine<sup>269</sup>. Le peptide trimérique apoA-I [166-183] obtenu par ligation chimio-sélective, a été purifié par gel filtration sur une colonne TSK HW40s (900x 16 mm). A l'issue de cette synthèse, aucune forme intermédiaire, monomérique ou dimérique branchée, n'a été mise en évidence. Une étape de purification supplémentaire en RP-HPLC sur colonne C18 a été nécessaire pour obtenir le peptide trimérique apoA-I [166-183] selon une pureté compatible avec une analyse par RMN.

### 3. CARACTERISATION DES PEPTIDES DENDRIMERIQUES ISSUS DE L'APOA-I

#### 3.1. Identification

La synthèse récurrente sans *capping* donne naissance à une population largement majoritaire de chaînes peptidiques correspondant au produit attendu mais également à des familles minoritaires de peptides délétés d'un ou de plusieurs acides aminés. Ces dernières possèdent des propriétés physico-chimiques voisines les unes des autres et proches du peptide attendu. Ceci a rendu impossible toute purification supplémentaire des produits bruts de coupure

HF des peptides dendrimériques. Ils ont toutefois été soumis à une dialyse contre de l'eau ultra-pure pour éliminer le maximum de sous-produits de petites masses résultant de la réaction de coupure.

La stratégie de synthèse sans *capping* limite également les possibilités d'identification des peptides branchés. La polymérisation entraîne une augmentation importante du poids moléculaire du peptide qui sort alors de la gamme d'analyse du spectromètre de masse à désorption plasmatique (PD-MS). D'autre part, la présence de peptides délétés entraîne une multiplication des pics de masse par la technique en *electron-spray* (ES-MS), ce qui empêche toute interprétation des spectres. L'analyse d'acides aminés a donc constitué la méthode la plus appropriée pour vérifier l'identité des peptides branchés. Cette technique permet de déterminer si un problème de synthèse est intervenu et éventuellement de cerner l'étape problématique. Cependant, cette méthode ne fournit qu'une valeur moyenne et ne permet pas de déterminer avec précision les positions délétées. Bien qu'imparfaite, cette méthode a constitué le seul critère d'identification de nos constructions peptidiques branchées. Les résultats de l'analyse d'acides aminés de chaque peptide sont présentés dans les **tableaux 7, 8 et 9**. Ils montrent une bonne concordance entre la composition mesurée et la composition théorique en acides aminés.

**Tableau 7. Compositions en acides aminés théorique et mesurée des trimère, tétramère et octamère apoA-I [166-183] dialysés.**

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un système chromatographique d'échange de cations haute performance *Beckman Analyser 6300* (Fullerton, USA) après hydrolyse acide des peptides par l'HCl 6N, en présence de phénol 5% (en volume), pendant 24 heures, à 110°C. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus.

	Trimère apoA-I [166-183]		Tétramère apoA-I [166-183]		Octamère apoA-I [166-183]	
	Théorique	Mesurée	Théorique	Mesurée	Théorique	Mesurée
Asp	3	2,66	4	4,72	8	8,14
Ser	3	3,40	4	5,65	8	8,44
Glu/Gln	12	14,86	16	16,49	32	33,69
Ala	9	10,15	12	11,28	24	23,69
Leu	12	14,81	16	15,35	32	31,28
Tyr	3	3,68	4	2,71	8	6,35
Lys	6	7,86	7	7,76	13	13,21
Arg	9	9,38	12	11,39	24	22,36

**Tableau 8. Compositions en acides aminés théorique et mesurée des trimère et tétramère apoA-I [145-183] dialysés.**

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un système chromatographique d'échange de cations haute performance *Beckman Analyser 6300* (Fullerton, USA) après hydrolyse acide des peptides par l'HCl 6N, en présence de phénol 5% (en volume), pendant 24 heures, à 110°C. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus.

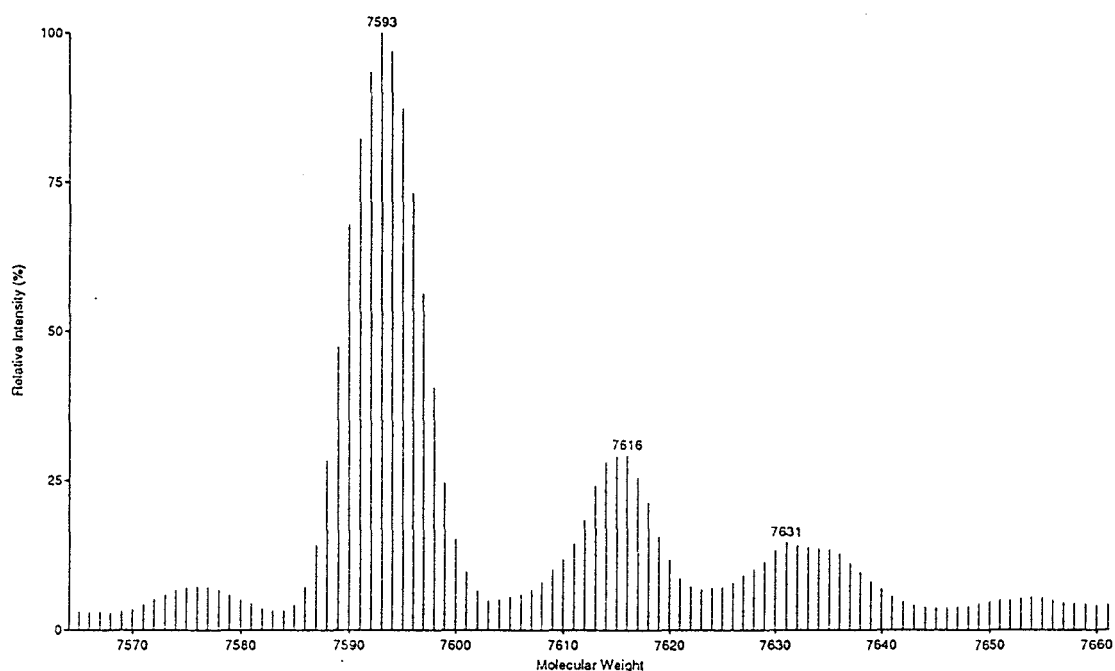
	Trimère apoA-I [145- 183]		Tetramère apoA-I [145-183]	
	Théorique	Mesurée	Théorique	Mesurée
Asp	9	8,18	12	12,4
Thr	3	2,25	4	3,95
Ser	3	3,42	4	4,12
Glu/Gln	18	22,3	24	24,6
Pro	3	3,40	4	4,95
Gly	3	2,18	4	4,52
Ala	21	23,7	28	26,9
Val	3	1,87	4	3,87
Met	3	2,11	4	3,28
Leu	18	22,2	24	25,5
Tyr	3	3,61	4	3,99
His	6	3,46	8	6,75
Lys	6	7,81	7	8,16
Arg	21	21,9	28	27,5

**Tableau 9. Compositions en acides aminé théorique et mesurée du tétramère apoA-I [102-140] dialysé.**

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un système chromatographique d'échange de cations haute performance *Beckman Analyser 6300* (Fullerton, USA) après hydrolyse acide des peptides par l'HCl 6N, en présence de phénol 5% (en volume), pendant 24 heures, à 110°C. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus.

	Tétramère apoA-I [102-140]	
	Théorique	Mesurée
Asp	8	7,43
Glu/Gln	56	57,8
Pro	4	5,29
Gly	4	4,42
Ala	8	8,2
Val	4	3,13
Met	4	3,61
Leu	20	19,7
Phe	4	3,69
Tyr	4	3,81
His	4	3,1
Lys	23	22,9
Arg	12	11,8

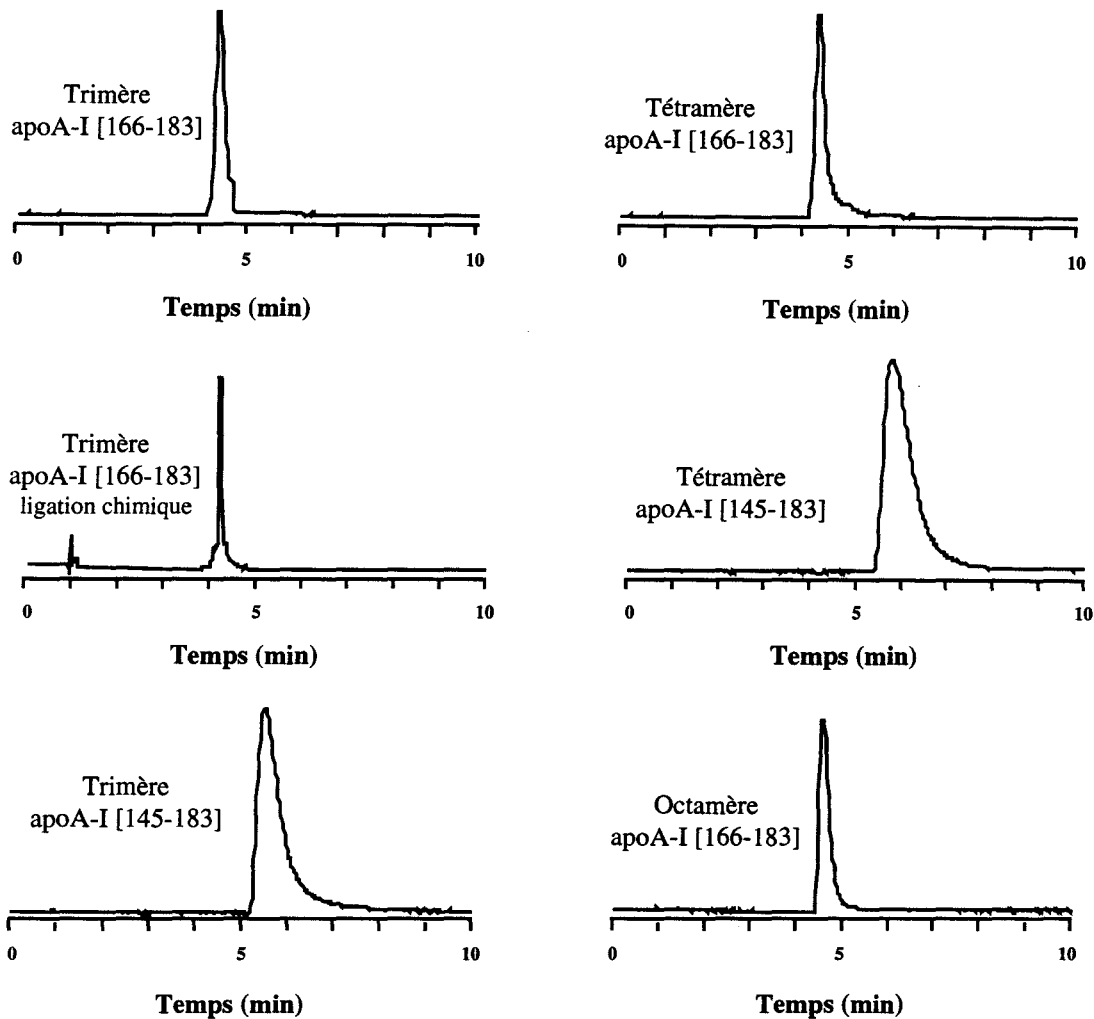
La synthèse par ligation chimio-sélective, permet d'obtenir des peptides dendrimériques à haut degré de pureté, compatibles avec des méthodes de caractérisation performantes et avec l'analyse par RMN. Ainsi, le peptide trimérique apoA-I [166-183] a pu être caractérisé par spectrométrie de masse ES/MS. La masse attendue du peptide (7593 Da) est retrouvée sur le profil ES/MS présenté sur la **figure 39**.



**Figure 39.** Spectre de masse en mode d'ionisation *electron-spray* (ES-MS) du peptide trimérique apoA-I [166-183] obtenu par ligation chimio-sélective. Le mode de désorption (*electron-spray*) permet de générer des ions en phase gazeuse dans un champ électrique très élevé ( $10^6$  V/m) à partir de l'échantillon en solution. Ces ions sont ensuite séparés et identifiés grâce à un analyseur quadripolaire.

### 3.2. Homogénéité

L'homogénéité des peptides dendrimériques construits sur la base des séquences 145-183, 166-183 et 102-140 de l'apoA-I humaine a été étudiée par électrophorèse capillaire. L'appareillage utilisé était un système Applied Biosystems model 270 A (Foster City, CA). Les conditions d'analyse ont été identiques à celles utilisées pour les peptides linéaires. Les profils électrophorétiques obtenus sont présentés sur la **Figure 40**. Ces profils, avec ceux obtenus en RP-HPLC (**Figure 37**), ont permis de mettre en évidence la relative homogénéité des constructions dendrimériques synthétisées. L'analyse par électrophorèse capillaire a également confirmé l'homogénéité importante du trimère apoA-I [166-183] obtenu par ligation chimio-sélective.



**Figure 40. Profils électrophorétiques des peptides dendrimériques dialysés, obtenus en électrophorèse capillaire.**

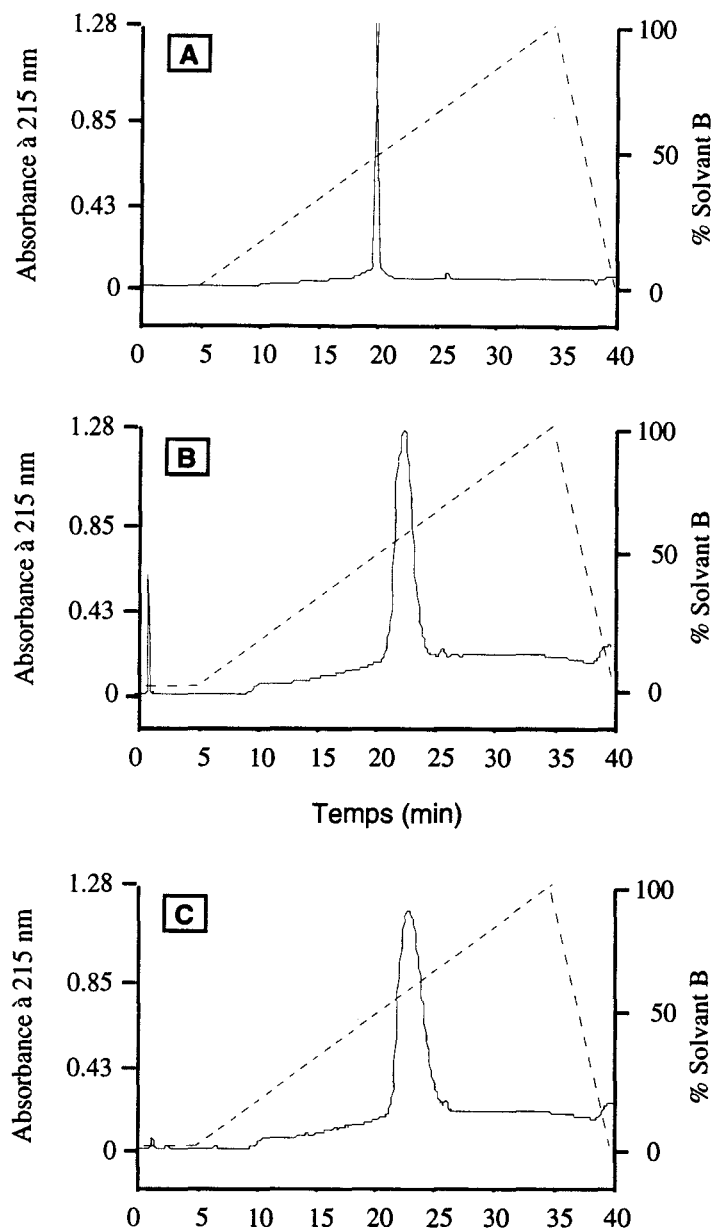
Electrophorèse capillaire Applied Biosystems model 270 A (Foster city, CA), 25 kV de tension appliquée, capillaire en silice de 50 cm de longueur et de 50  $\mu$ m de diamètre. La séparation a été effectuée à 30°C dans un tampon citrate de sodium 20 mM à pH 2,5. La détection a été réalisée à 200 nm.

#### 4. ASSOCIATION DES PEPTIDES DENDRIMERIQUES AVEC LES PHOSPHOLIPIDES

##### 4.1. Etude du comportement des différentes constructions dérivées de la séquence apoA-I [145-183] en RP-HPLC

Le comportement en RP-HPLC ( $C_4$ ) du peptide linéaire apoA-I [145-183] a été comparé avec celui des peptides trimérique et tétramérique correspondants.





**Figure 41. Profils RP-HPLC du peptide apoA-I [145-183] (A) et des peptides apoA-I [145-183] tétramérique (B) et trimérique (C).**

Colonne (1 x 200 mm) avec silice greffée  $C_4$ , 9 nm de porosité pour 10  $\mu$ m de diamètre (Vydac Hesperia, CA,USA), gradient linéaire de 0 à 100% de solvant B en 30 min, débit 1 ml/min, système éluant : solvant A. TFA 0,05% dans  $H_2O$  (en volume); solvant B. TFA 0,05%  $CH_3CN$  60% dans  $H_2O$  (en volume).

A : peptide linéaire apoA-I [145-183]

B : trimère apoA-I [145-183]

C : tétramère apoA-I [145-183]

La **figure 41** fait clairement apparaître un temps de rétention plus important pour le peptide trimérique (22,46 min) et le peptide tétramérique (22,58 min) apoA-I [145-183], par rapport au peptide linéaire apoA-I [145-183] (19,81 min). La différence de temps de rétention

entre les 2 types de peptides (linéaire et dendrimérique) est significative : plus de 2,5 min par rapport à un gradient d'élution de 30 minutes. Le peptide linéaire a été élué d'abord et ceci est en accord avec l'hypothèse d'une plus grande capacité d'association des peptides dendrimériques avec les chaînes aliphatiques. Toutefois, cet effet de rétention sur la colonne, indépendant de la séquence, atteint rapidement un maximum car il n'existe qu'une très faible différence (7 secondes) entre les temps de rétention du peptide trimérique et du peptide tétramérique.

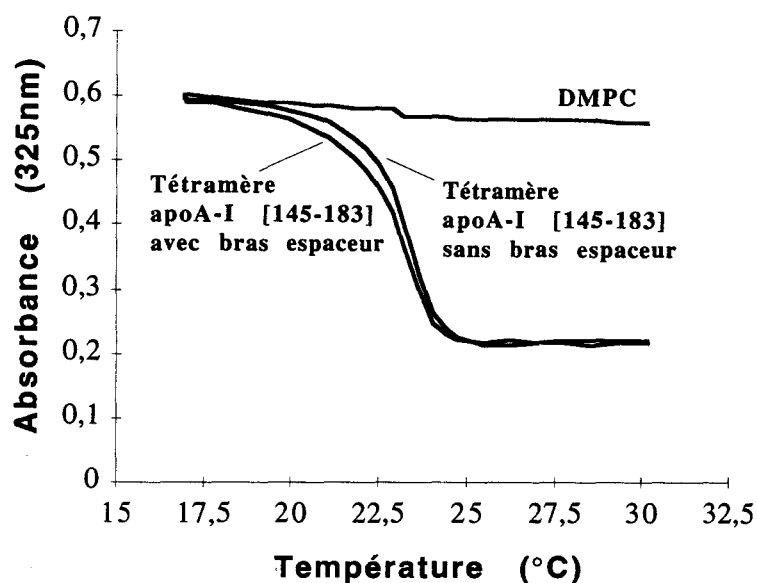
Cette observation va dans le sens de l'influence d'un effet de coopérativité entre les hélices amphipathiques des constructions dendrimériques lors de l'interaction avec les chaînes aliphatiques de la phase. Cette fixation ne dépend pas seulement de l'augmentation de la masse moléculaire du peptide, et donc de son caractère amphipathique global, car alors le peptide tétramérique serait plus retardé sur la phase inverse que le peptide trimérique. Par ailleurs, l'effet coopératif est confirmé par la durée de l'élution des peptides dendrimériques apoA-I [145-183]. En dépit des micro-hétérogénéités engendrées par la stratégie de synthèse, l'allure des pics peut effectivement être interprétée comme un comportement anormal de ces peptides dendrimériques vis à vis de la phase aliphatique. La coopérativité des hélices dans ce type de construction rendrait moins efficace l'élution par la phase mobile et conduirait à des phénomènes d'agrégation de ces peptides sur la phase stationnaire apolaire.

#### 4.2. Mesures de turbidité

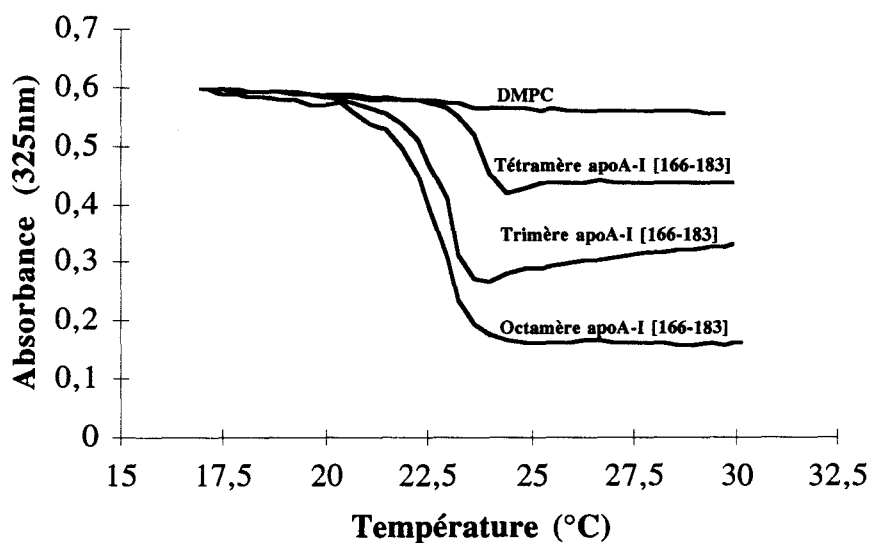
L'influence de la distance entre le réseau de lysine et le peptide sur l'association aux phospholipides a été étudiée avec le peptide tétramérique apoA-I [145-183]. Dans ce but, deux constructions, l'une comportant des bras espaceurs (acide 4-amino butanoïque) entre les résidus de lysines et les segments d'apoA-I et l'autre n'en comportant pas, ont été synthétisées.

La capacité de ces deux constructions à clarifier une solution de DMPC a été estimée par une mesure de turbidité dont les résultats sont présentés sur la **figure 42**.

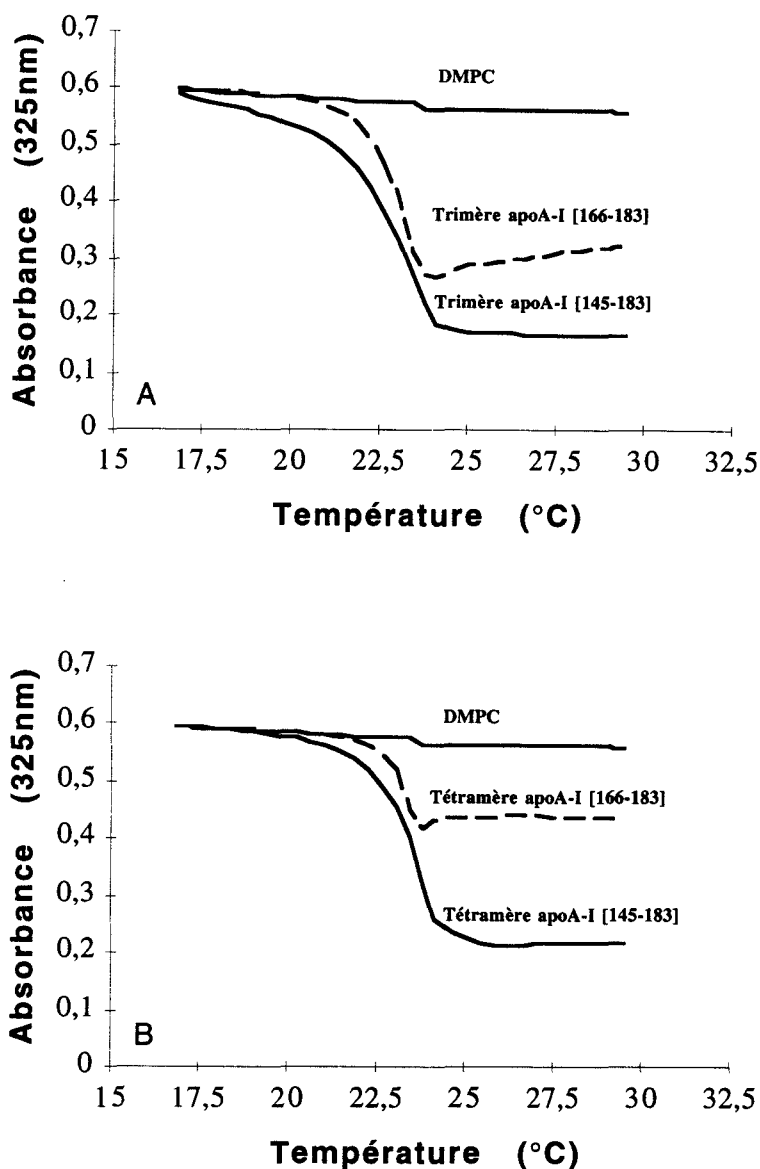
L'expérience montre que la présence du bras espaceur ne modifie pas les capacités d'association du peptide apoA-I [145-183] tétramérique aux phospholipides. Ceci signifie que le degré de liberté accordé aux hélices par les résidus de lysine est suffisant pour permettre l'association des hélices amphipathiques avec le DMPC. A la suite de cette expérience préliminaire, toutes les constructions dendrimériques ont été synthétisées sans inclure de bras espaceur entre l'arborescence de lysine et les séquences peptidiques.



**Figure 42. Etude de l'influence d'un bras espaceur (acide 4-amino butanoïque) sur l'association du peptide apoA-I [145-183] tétramérique avec le DMPC.** L'association a été suivie par mesure de l'absorbance à 325 nm en fonction de la température. Rapport DMPC/peptide utilisé : 2/1 (en masse).



**Figure 43. Etude de l'influence du type de construction dendrimérique apoA-I [166-183] sur l'association au DMPC.** L'association a été suivie par mesure de l'absorbance à 325 nm en fonction de la température. Rapport DMPC/peptide utilisé : 2/1 (en masse).



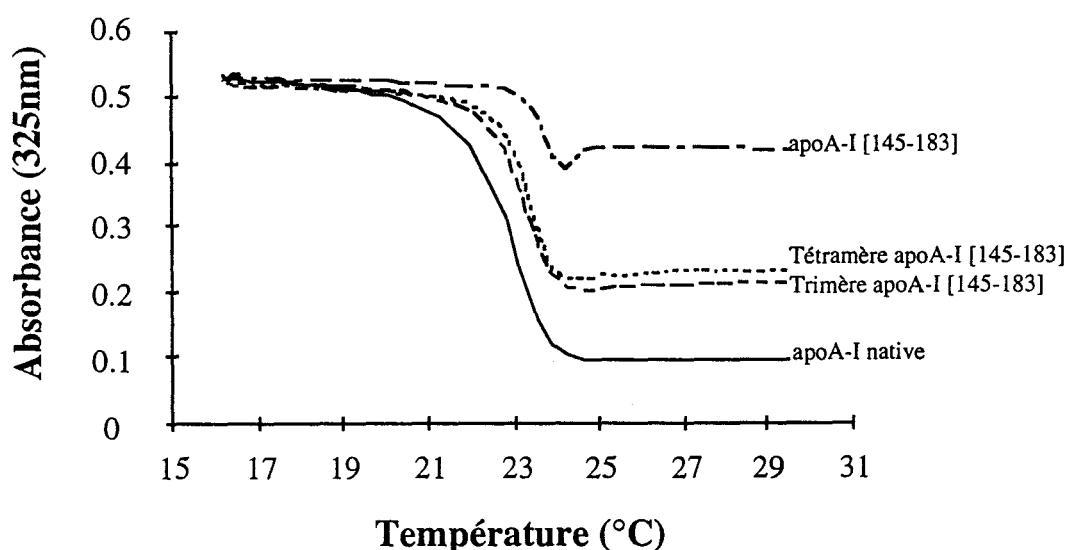
**Figure 44. Etude de l'influence du motif structural sur l'association de constructions de type trimérique (A) et tétramérique (B) au DMPC.** L'association a été suivie par mesure de l'absorbance à 325 nm en fonction de la température. Rapport DMPC/peptide utilisé : 2/1 (en masse).

La capacité des différents peptides dendrimériques à clarifier des suspensions de vésicules multilamellaires de DMPC, et donc à s'associer à ce phospholipide a été estimée par mesures de turbidité. Les résultats sont présentés sur les **figures 43, 44, et 45**.

Sur la **figure 43** sont présentées les expériences de turbidité effectuées avec les peptides dendrimériques construits à partir de la séquence 166-183 de l'apoA-I (1 seule hélice

amphipathique). Elles indiquent que ces peptides tétramérique, trimérique et octamérique possèdent tous trois la capacité de s'associer avec des vésicules multilamellaires de DMPC pour donner des complexes DMPC/peptide solubles. Cependant, les capacités d'association des 3 peptides diffèrent et c'est la construction octamérique qui semble la plus efficace pour s'associer aux phospholipides.

L'étude concernant les peptides linéaires, présentée dans le chapitre précédent, a montré que le motif [145-183] de l'apoA-I (2 hélices amphipathiques séparées par un coude) possède une capacité d'association aux phospholipides supérieure que celle du segment 166-183 (1 seule hélice amphipathique). Les données présentées sur la **figure 44** confirment ce résultat puisque les peptides trimérique et tétramérique construits à partir de la séquence [145-183] ont une capacité d'association au DMPC supérieure aux mêmes types de constructions pour lesquelles la séquence 166-183 est utilisée comme unité structurale. Il semble donc que l'effet coopératif, mis en évidence entre les 2 hélices du motif 145-183 de l'apoA-I, soit conservé au sein des constructions dendrimériques. De plus, l'instabilité de l'association engendrée par les constructions à 1 hélice est confirmée au niveau du trimère et du tétramère apoA-I [166-183] pour lesquels on observe une légère augmentation de la turbidité du milieu au-delà de la température de transition du DMPC. Ce phénomène n'est en revanche pas observé avec les constructions dendrimériques possédant le motif de répétition hélice-coude-hélice.



**Figure 45. Etude de l'influence du type de construction sur l'association au DMPC de la séquence apoA-I [145-183].**  
L'association a été suivie par mesure de l'absorbance à 325 nm en fonction de la température.  
Rapport DMPC/peptide utilisé : 2/1 (en masse).

La **figure 45** présente une comparaison de l'association au DMPC du peptide tétramérique apoA-I [145-183], du peptide trimérique apoA-I [145-183], du peptide linéaire apoA-I [145-183], et de l'apoA-I native. Au rapport DMPC/peptide utilisé, on constate que l'ajout de peptide linéaire apoA-I [145-183] à la suspension de DMPC n'entraîne qu'une diminution limitée et légèrement réversible de la turbidité du milieu. En revanche, les peptides trimérique et tétramérique apoA-I [145-183] montrent une capacité d'association au DMPC plus importante. La diminution de l'absorbance à 325 nm observée pour chacun des deux peptides dendrimériques est comparable et représente 80% de la diminution observée avec l'apoA-I native. Ces résultats confirment donc la faible capacité d'association du peptide linéaire apoA-I [145-183] aux phospholipides et démontrent les propriétés mimétiques intéressantes des peptides dendrimériques apoA-I [145-183].

## 5. RECONSTITUTION ET CARACTERISATION DE HDL DISCOÏDALES

### 5.1. Reconstitution et purification de HDL discoïdales

De la même façon qu'avec les peptides linéaires, deux type de phospholipides (DMPC et DPPC) ont été utilisés pour la reconstitution de HDL avec les peptides dendrimériques. Les techniques de production des complexes étaient également identiques (voir chap. III.5.1) :

**DMPC** Obtention de petites vésicules unilamellaires (SUV) par sonication de grandes vésicules multilamellaires (MLV) et incubation de ces vésicules en présence du peptide à caractériser (rapport DMPC/peptide 2/1 en poids), à 25°C, pendant 16 heures, dans un tampon Tris/HCl pH 8,1.

**DPPC** Obtention de petites vésicules unilamellaires (SUV) par incubation des MLV avec du cholate de sodium pendant 2 heures à 43°C et incubation de ces vésicules en présence du peptide à caractériser (rapport DMPC/Peptide 3/1 en poids), à 43°C, pendant 16 heures, dans un tampon Tris/HCl pH 8,1. Enfin l'élimination du cholate de sodium est assurée par chromatographie d'adsorption sur bille de polystyrène divinylbenzène (Bio-Beads SM-2, Bio-Rad).

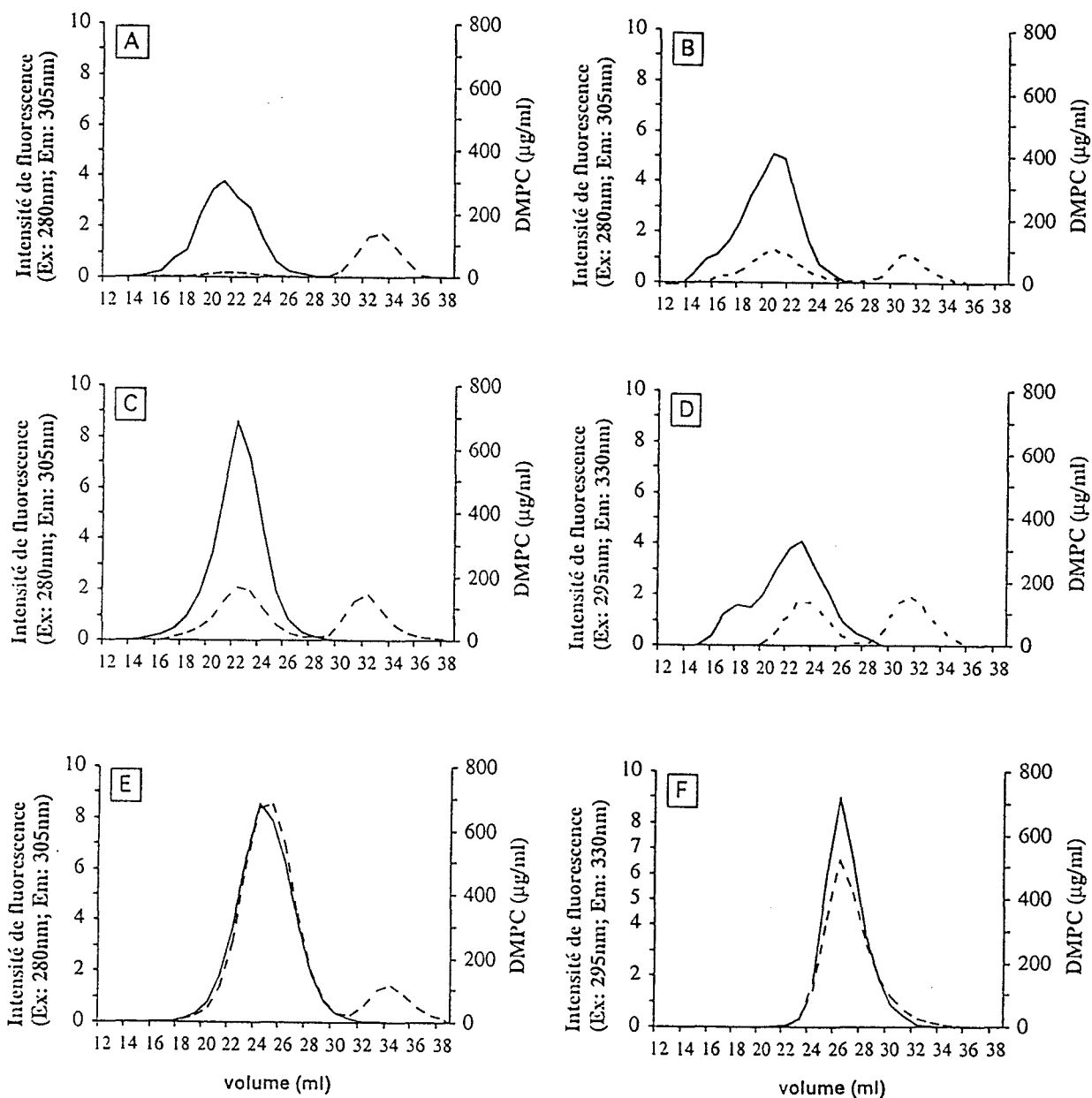
La séparation des complexes DMPC/peptide et DPPC/peptide a été effectuée par chromatographie de gel filtration sur une colonne Superose 6PG à température ambiante. Les fractions obtenues ont ensuite été caractérisées, d'une part, du point de vue de leur contenu en peptide par la fluorescence de la tyrosine ( $\lambda$  absorption : 280 nm,  $\lambda$  émission : 305 nm) et, d'autre part, du point de vue de leur teneur en phospholipides à l'aide d'un kit de dosage enzymatique spécifique (Biomerieux). Les profils de séparation correspondant aux complexes

DMPC/peptides obtenus, avec les constructions dendrimériques, sont présentés sur la **figure 46**.

Pour chacun des peptides dendrimériques présentés, on constate la formation de complexes DMPC/peptides caractérisés par la présence d'un pic élué vers 20 ml pour lequel la présence simultanée de lipides et de peptide est mise en évidence. Selon le peptide considéré, on retrouve plus ou moins de matériel lipidique libre sous la forme d'un pic élué en début de séparation ainsi que de peptide non lié, élué tardivement. Pour l'apoA-I native, aucun matériel libre n'est retrouvé. Ainsi, l'obtention de ces complexes s'est effectuée avec des rendements différents suivant le peptide ou la protéine utilisés. Ces rendements, correspondant aux pourcentages de peptide complexé, ont été les suivants :

DMPC/apoA-I [145-183] :	5%
DMPC/tétramère apoA-I [102-140]	45%
DMPC/trimère apoA-I [166-183]	64%
DMPC/tétramère apoA-I [145-183]	60,5%
DMPC/trimère apoA-I [145-183]	85,5%
DMPC/apoA-I native	100%

Ces rendements constituent un bon critère de comparaison de la complexation de peptides ou de protéines avec le DMPC. Outre la confirmation de la faible capacité de complexation du peptide linéaire apoA-I [145-183], ils montrent une augmentation radicale de la quantité de matériel complexé avec les peptides dendrimériques. Par ailleurs, ils confirment que les peptides construits avec la séquence 166-183 (1 hélice) sont moins efficaces que les constructions dendrimériques équivalentes utilisant la séquence 145-183 (hélice-coude-hélice) pour s'associer aux phospholipides. Parmi tous les peptides testés, le peptide apoA-I [145-183] trimérique semble la construction la plus apte à se complexer avec le DMPC pour former des HDL reconstituées. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus lors des mesures de turbidité. Enfin, le tétramère apoA-I [102-140] possède un rendement de complexation bien inférieur à la construction correspondante basée sur la séquence 145-183. Bien que la séquence 102-140 soit potentiellement structurée en un motif hélice-coude-hélice, ce résultat montre la faible capacité de la séquence 102-140 à s'associer aux phospholipides pour former des HDL reconstituées.



**Figure 46. Profils de séparation des complexes DMPC/peptides linéaires ou dendrimériques ou DMPC/apoA-I sur colonne Superose 6PG.**

La concentration en lipides en  $\mu\text{g/ml}$ , en trait plein et l'intensité de fluorescence de la tyrosine ou du tryptophane en pointillés sont représentées en fonction du volume d'élution de la colonne.

A : DMPC/apoA-I [145-183]

B : DMPC/trimère apoA-I [166-183]

C : DMPC/tétramère apoA-I [145-183]

D : DMPC/tétramère apoA-I [102-140]

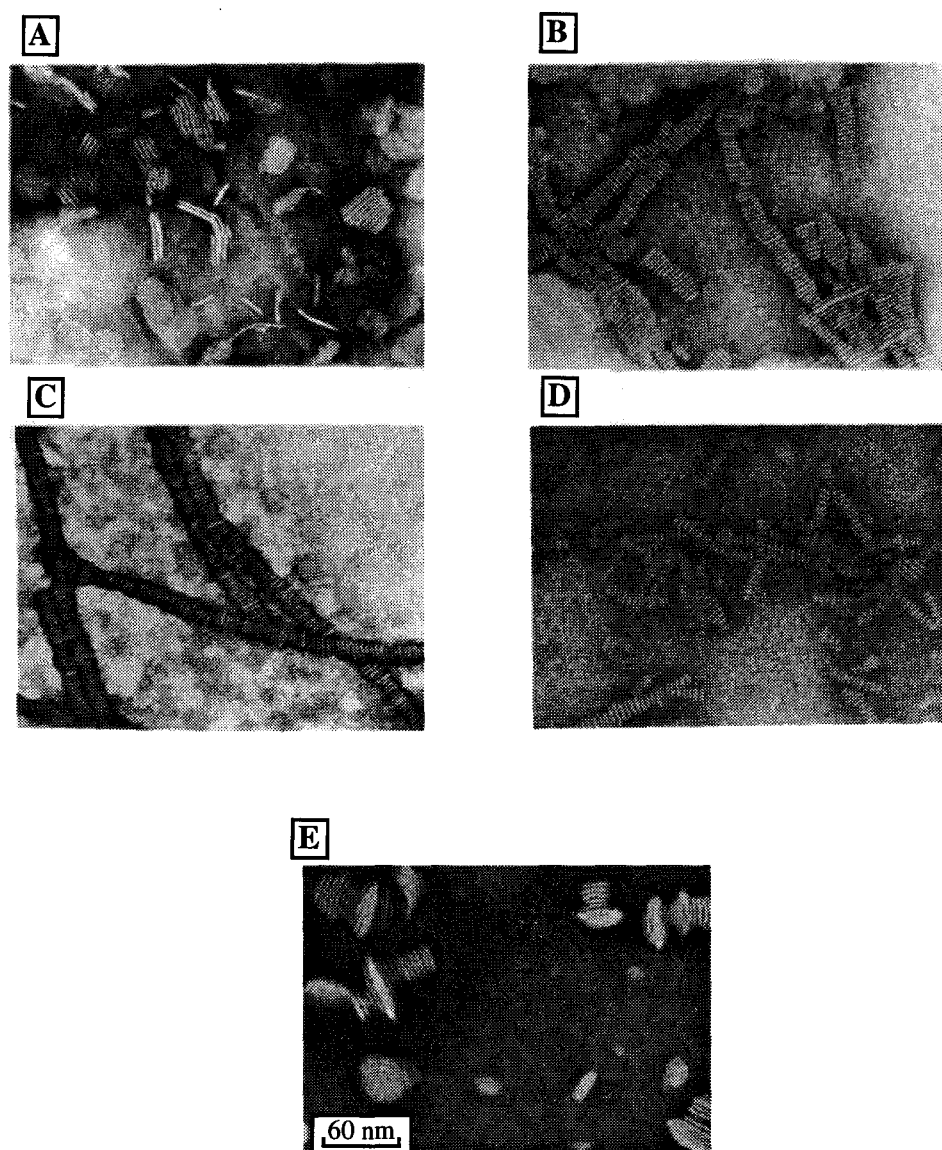
E : DMPC/trimère apoA-I [145-183]

F : DMPC/apoA-I.



Des profils de purification et des rendements de complexation comparables ont été obtenus en utilisant le DPPC comme phospholipide pour la reconstitution d'HDL.

## 5.2. Microscopie électronique



**Figure 47.** HDL reconstituées avec le peptide linéaire apoA-I [145-183], les peptides dendrimériques apoA-I [145-183] et apoA-I [102-140] ou l'apoA-I native, observées par microscopie électronique.

A : apoA-I [145-183]    B : tétramère apoA-I [145-183]

C : trimère apoA-I [145-183]    D : apoA-I native

E : tétramère apoA-I [102-140]

A ce stade de l'étude, rien ne permettait d'affirmer que les complexes DMPC/peptide purifiés possédaient la forme discoïdale attendue. C'est pourquoi les complexes purifiés ont été analysés en microscopie électronique à transmission. Pour cela, les échantillons ont été préparés et analysés suivant le même protocole que celui exposé dans le chapitre consacré à l'étude des peptides linéaires de l'apoA-I (voir chap. III.6.2).

Les clichés des complexes formés entre le DPPC et les peptides dendrimériques (**Figure 47**) révèlent des profils caractéristiques de disques disposés en rouleaux les uns sur les autres. La photographie des complexes formés de DPPC et de peptide linéaire apoA-I [145-183] est présentée en référence (**Figure 47A**). Les disques formés avec ce peptide sont hétérogènes et possèdent une taille moyenne très supérieure à celle des complexes reconstitués avec l'apoA-I native (**Figure 47D**). En revanche, les photographies obtenues avec les peptides dendrimériques apoA-I [145-183], et en particulier avec le trimère apoA-I [145-183] (**Figure 47A**), révèlent des particules discoïdales beaucoup plus homogènes et dont la taille moyenne semble proche de celles des HDL reconstituées avec l'apoA-I native.

Enfin, les complexes obtenus avec le peptide tétramérique apoA-I [102-140] (**Figure 47E**) sont également discoïdaux bien que plus larges et très hétérogènes comparativement aux particules reconstituées avec l'apoA-I native ou les dendrimères d'apoA-I [145-183].

### 5.3. Caractérisation physico-chimique des HDL reconstitués

Les complexes discoïdaux DMPC ou DPPC/peptides dendrimériques ont été caractérisés du point de vue de leur propriétés physico-chimiques (rapport molaire phospholipides/peptide, nombre de moles de phospholipides par hélice, nombre de moles de peptides par complexes et rayon de Stokes). L'ensemble de ces mesures a été obtenue de la même manière que celles présentées dans le chapitre précédent (voir chap. III.6.3). Les résultats obtenus (**tableau 10**) sont comparés aux valeurs obtenues avec le peptide linéaire et l'apoA-I native.

Les rapports molaires phospholipides/peptide, obtenus avec les peptides dendrimériques, sont très proches du rapport mesuré avec l'apoA-I native alors que ce rapport est 3 à 4 fois plus important avec le peptide linéaire apoA-I [145-183]. Ce résultat suggère que l'arrangement des hélices de chaque peptide autour des disques de phospholipides est bien plus conforme au modèle natif au sein des peptides dendrimériques que dans le modèle linéaire. La taille des particules formées avec le trimère et le tétramère apoA-I [145-183] est également très proche de la taille des particules composées de phospholipides et d'apoA-I. Toutefois, comparativement au tétramère apoA-I [145-183], le peptide trimérique donne naissance à des complexes plus

proches de ceux obtenus avec l'apoA-I native, à la fois en terme de composition chimique et en terme de taille. Ces paramètres sont, en revanche, radicalement différents pour le peptide apoA-I [145-183] linéaire, puisque les complexes formés sont deux fois plus larges que les HDL reconstituées avec l'apoA-I native. Enfin, des résultats peu satisfaisants ont été obtenus avec le peptide tétramérique apoA-I [102-140] : les particules apparaissent plus larges et la composition chimique des complexes diffère de façon importante de celle obtenue avec le tétramère apoA-I [145-183]. En particulier, le nombre de moles de peptide par complexe est radicalement différent suggérant une organisation atypique des peptides autour des disques de phospholipides.

En conclusion, le peptide apoA-I [145-183] trimérique semble être, parmi les peptides dendrimériques synthétisés, la construction la plus à même de mimer les propriétés physico-chimiques de l'apoA-I au sein des HDL.

**Tableau 10. Composition chimique et taille des HDL reconstituées avec le peptide linéaire apoA-I [145-183], les tétramères apoA-I [145-183] et [102-140], le trimère apoA-I [145-183] ou l'apoA-I native et le DMPC ou le DPPC.**

Peptide ou protéine	Rapport molaire PL/Prot (a) $R_m$	nombre PL/hélice théorique	nombre hélices théoriques/complexe	mole prot/complexe n	rayon de Stokes mesuré (nm) (b)	rayon de Stokes calculé (nm) (c)
<b>Peptide linéaire apoA-I [145-183]</b>						
DMPC	101	50	16	8	12,4	11,6
DPPC	100	50	14	7	11,8	10,7
<b>Trimère apoA-I [145-183]</b>						
DMPC	86	14,3	12	2	5,9	5,6
DPPC	78	13	12	2	5,8	5,6
<b>Tétramère apoA-I [145-183]</b>						
DMPC	113	14	16	2	7,4	6,9
DPPC	120	15	24	3	8,7	8,3
<b>Tétramère apoA-I [102-140]</b>						
DMPC	87	10,9	72	9	10,2	11,7
DPPC	56	7	56	7	8,6	8,2
<b>ApoA-I native</b>						
DMPC	91	15	12	2	5,7	5,4
DPPC	85	14	12	2	5,5	4,9

(a) : PL : phospholipides, Prot : apoA-I native ou peptide apoA-I [145-183]

(b) : mesuré en fonction du volume d'éluion du complexe sur la colonne Superose 6PG

(c) : calculé selon l'équation (3) du chap. III.6.3.

#### 5.4. Polarisation de fluorescence

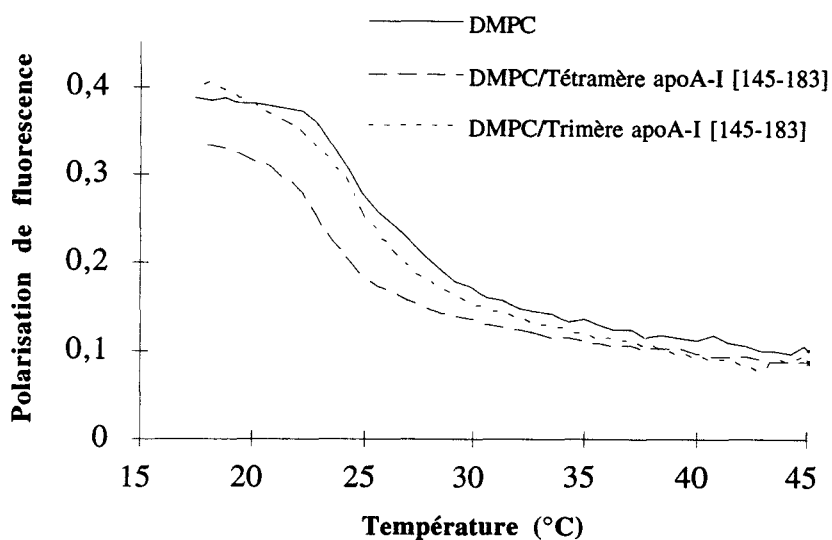


Figure 48. Suivi de la polarisation de fluorescence du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène au sein des complexes DMPC/polymères apoA-I [145-183] ou de simples molécules de DMPC.

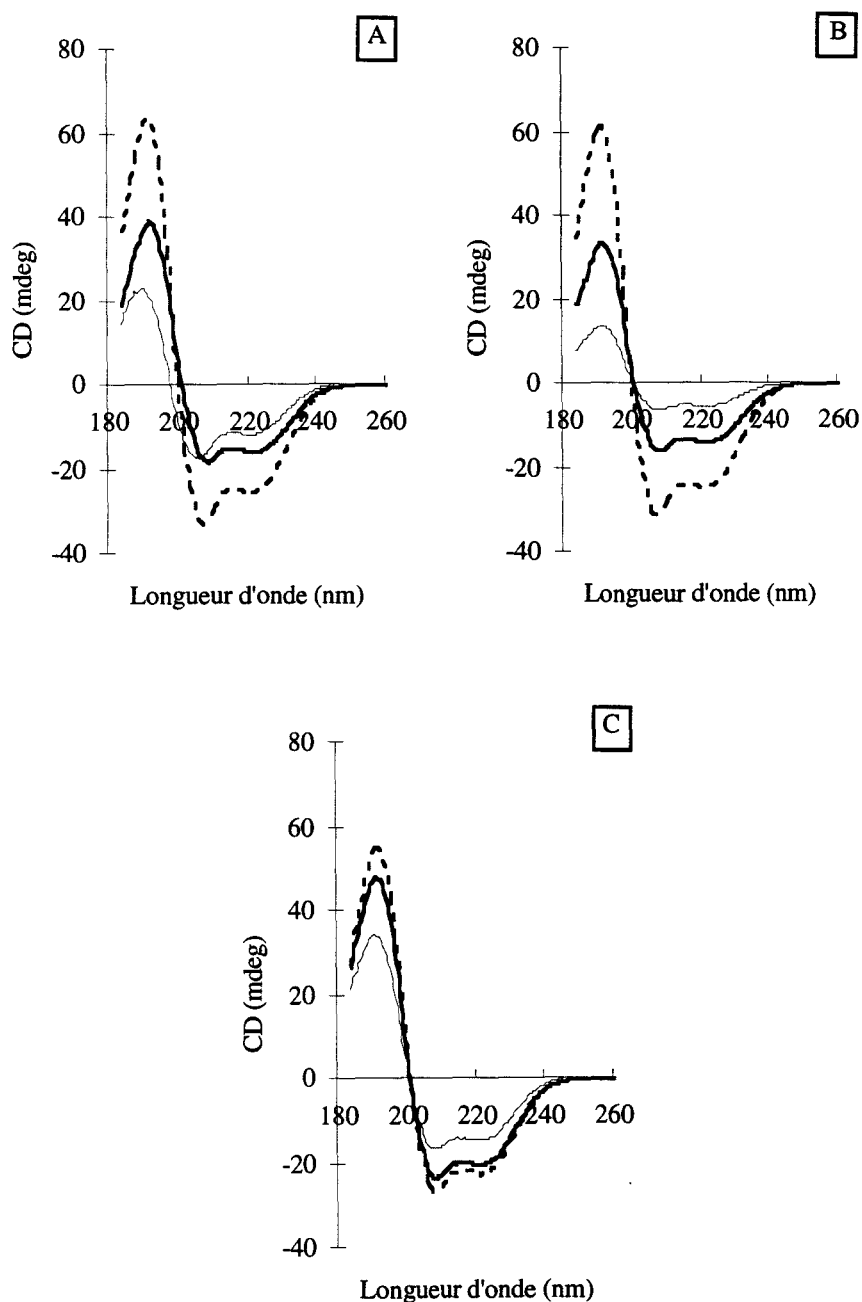
L'effet des peptides ou des protéines sur la stabilité de la bicouche phospholipidique au sein des complexes purifiés a pu être évalué en suivant le degré de mobilité des chaînes alkyles des phospholipides en fonction de la température. La sonde utilisée est le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH), composé hydrophobe et fluorescent qui s'intercale entre les chaînes alkyles des phospholipides (voir chap. III.6.5). Les résultats de ces expériences de polarisation du DPH au sein de complexes purifiés sont présentés sur la **figure 48**. Ils mettent en évidence le faible degré de mobilité des chaînes alkyles de DMPC au sein des complexes DMPC/peptides dendrimériques comparativement au DMPC seul. En particulier, la stabilisation des particules discoïdales par le tétramère apoA-I [145-183] est importante. Cet effet, quoique moins marqué, est aussi mis en évidence avec le trimère apoA-I [145-183].

#### 6. STRUCTURE SECONDAIRE

Une étude expérimentale par dichroïsme circulaire et RMN réalisées sur les peptides linéaires apoA-I [166-183] et [145-183] nous a permis de vérifier la prédiction structurale selon laquelle le fragment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I est organisé en paire d'hélices séparées par un coude (voir chap. III.6.7 et III.6.8). Afin de savoir si cette structuration est toujours

présente au sein des constructions dendrimériques synthétisées, de nouvelles études de dichroïsme circulaire et de RMN ont été entreprises.

### 6.1. Dichroïsme circulaire



**Figure 49. Spectres de dichroïsme circulaire des peptides trimère (A) et tétramère (B) apoA-I [145-183] et de l'apoA-I native (C) à pH 7,4 et à 23°C.**

Ligne pleine fine : Tampon phosphate 10 mM pH 7,4

Ligne pleine forte : HDL reconstituées avec le peptide et du DPPC

Pointillés : TFE 50% (en volume) dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4

Les pourcentages de structures secondaires des peptides dendrimériques ont été mesurés à l'aide d'un spectropolarimètre JASCO 710 calibré avec une solution d'acide (+)-10-camphorsulfonique 0,06% (en masse). Les conditions d'accumulation des spectres étaient identiques à celles utilisées lors des études sur les peptides linéaires (chap. III.6.7). Les différents spectres obtenus sont présentés sur la **figure 49**. Trois types d'environnement ont été choisis pour effectuer les mesures :

- tampon phosphate 10 mM pH 7,4
- HDL reconstituées et purifiées sur colonne Superose 6PG
- solution tampon phosphate/ TFE 1/1 (en volume)

La méthode de calcul utilisée pour la détermination des pourcentages de structure secondaire est celle publiée par Compton et Johnson<sup>127</sup>. Les résultats sont présentés dans le **tableau 11**. D'après ces données, l'apoA-I native présente 50% d' $\alpha$ -hélicité en milieu aqueux. Ce résultat est en accord avec ceux de Sparks et coll.<sup>121</sup>, d'une part et ceux de Leroy et coll.<sup>123</sup>, d'autre part, qui observent respectivement 49 et 55% d' $\alpha$ -hélicité pour l'apoA-I non liée aux lipides. Les pourcentages d' $\alpha$ -hélicité des peptides trimérique (44%) et tétramérique apoA-I [145-183] (40%) sont très comparables en milieu aqueux et ces deux peptides sont un peu moins hélicoïdaux que la protéine native (50%).

**Tableau 11. Mesure de la structure secondaire des peptides tétramère et trimère apoA-I [145-183] et de l'apoA-I native déterminée par dichroïsme circulaire.**

Les mesures ont été effectuées sur les peptides en solution dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4, dans un mélange TFE/tampon phosphate 10 mM pH 7,4 (1/1 en volume) et sur les complexes DPPC/peptide purifiés sur colonne Superose 6PG. Les erreurs expérimentales sont de  $\pm 5\%$ .

	hélice- $\alpha$ (%)	feuillet- $\beta$ (%)	coude (%)	pelote (%)
<b>Tétramère</b>				
<b>apoA-I [145-183]</b>				
Tampon	44	2	27	27
HDL reconstituée	64	2	19	13
TFE 50%	82	1	17	0
<b>Trimère</b>				
<b>apoA-I [145-183]</b>				
Tampon	40	3	28	29
HDL reconstituée	64	4	17	15
TFE 50%	85	0	15	0
<b>ApoA-I native</b>				
Tampon	50	9	17	24
HDL reconstituée	75	0	19	6
TFE 50%	81	0	19	0

Comme cela est mentionné dans la littérature scientifique<sup>134</sup>, la présence de phospholipides entraîne une augmentation importante de l' $\alpha$ -hélicité de l'apoA-I native qui passe de 50% en solution dans le tampon phosphate à 75% dans les HDL reconstituées avec le DPPC. Cette caractéristique spécifique des apolipoprotéines échangeables est également observée avec les peptides trimérique et tétramérique apoA-I [145-183], dont les pourcentages d' $\alpha$ -hélicité passent respectivement de 44 à 64% et de 40 à 64% à la suite de l'association avec les phospholipides.

Des spectres correspondant aux peptides dendrimériques ont également été enregistrés dans un mélange de trifluoroéthanol (TFE) 50% (en volume) dans le tampon phosphate 10 mM pH 7,4. Dans ce mélange, le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité de l'apoA-I native augmente considérablement et passe à 81%. Ce résultat est en accord avec celui de Leroy et coll.<sup>149</sup> qui évaluent la proportion d' $\alpha$ -hélicité de l'apoA-I à 84% dans un mélange H<sub>2</sub>O/n-propanol 30%. Les proportions d' $\alpha$ -hélicité du tétramère et du trimère apoA-I [145-183] passent respectivement de 44 à 82% et de 40 à 85% dans le mélange TFE/tampon phosphate, confirmant ainsi le potentiel hélicoïdal marqué de ces peptides dans ce milieu apolaire. Comparativement, le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité du peptide apoA-I [145-183] linéaire n'atteint, lui, que 59% dans le TFE 50% (chap. III.6.7.).

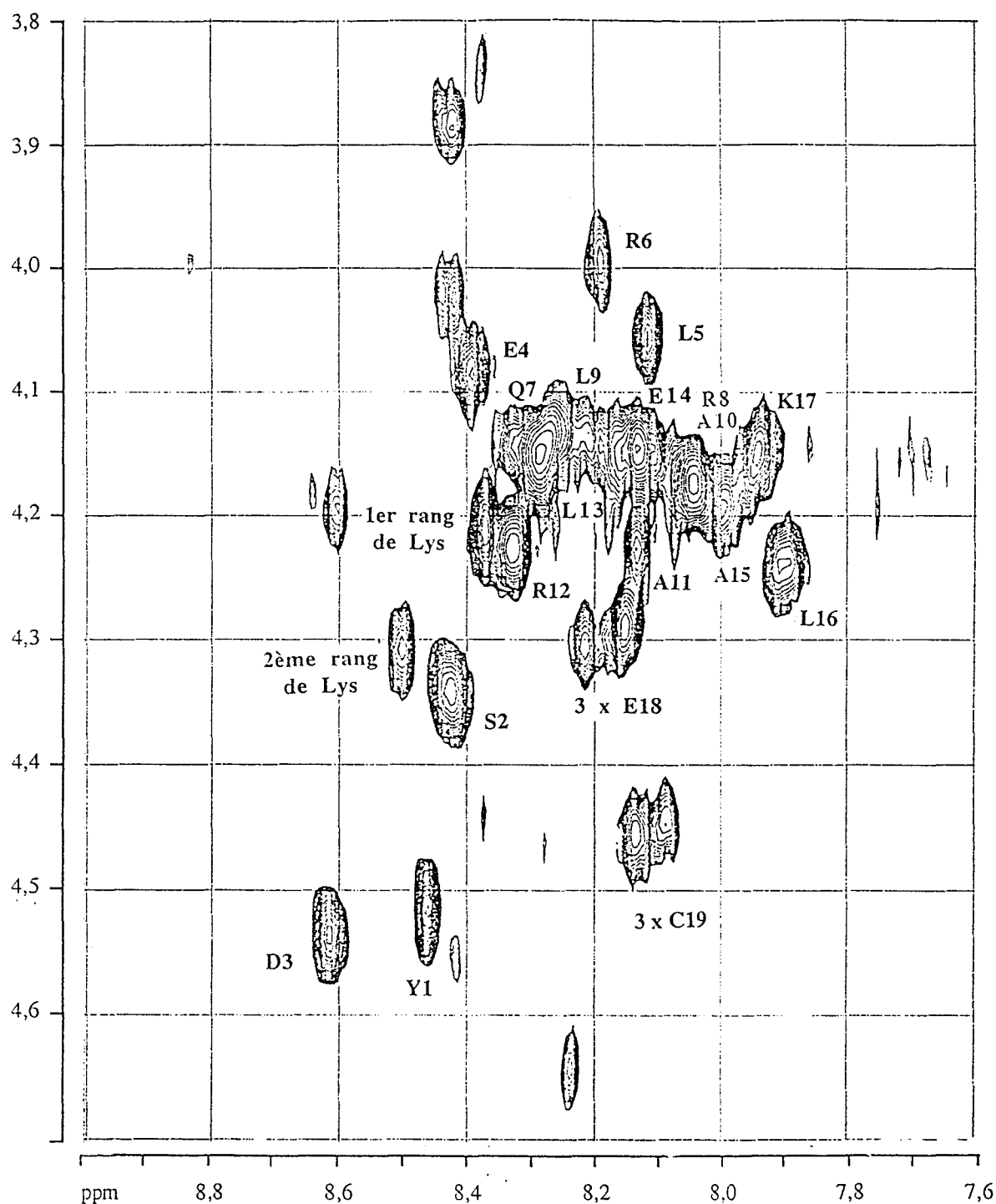
En conclusion, même si le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité des peptides dendrimériques apoA-I [145-183] apparaît inférieur à celui de l'apoA-I native libre en milieu aqueux, la structuration observée en présence de lipides ou dans un solvant de faible constante diélectrique comme le TFE permet de conclure à la capacité importante des peptides dendrimériques à mimer du point de vue structural, l'apolipoprotéine A-I dans les HDL reconstituées.

## 6.2. RMN.

Pour préciser plus finement la structure des constructions dendrimériques, un peptide trimérique modèle, de pureté compatible avec l'analyse par RMN, a été synthétisé par ligation chimio-sélective. Ce peptide résulte de la liaison de trois chaînes peptidiques apoA-I [166-183] possédant une cystéine en position C-terminale sur un arbre trimérique chloroacétylé. Le couplage a été assuré par la formation d'une liaison sulfure entre les fonctions chloroacétyles de la matrice et la fonction thiol de la cystéine de chaque peptide.

La concentration du peptide utilisée lors de l'étude RMN était 1 mM dans un mélange H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90/10 en volume), ajusté à pH 4 et les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 600-Mhz. Grâce à des séquences de type TOCSY (temps de mélange 100

ms) et NOESY (temps de mélange 200 ms) à 4°C, des spectres ont été obtenus. L'un d'eux (TOCSY) est présenté sur la **figure 50**.



**Figure 50.** Spectre ( $^1\text{H}$ ) TOCSY du peptide trimérique apoA-I [166-183] enregistré à 4°C, un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90/10, en volume), à pH 4 et à une concentration de 1 mM.



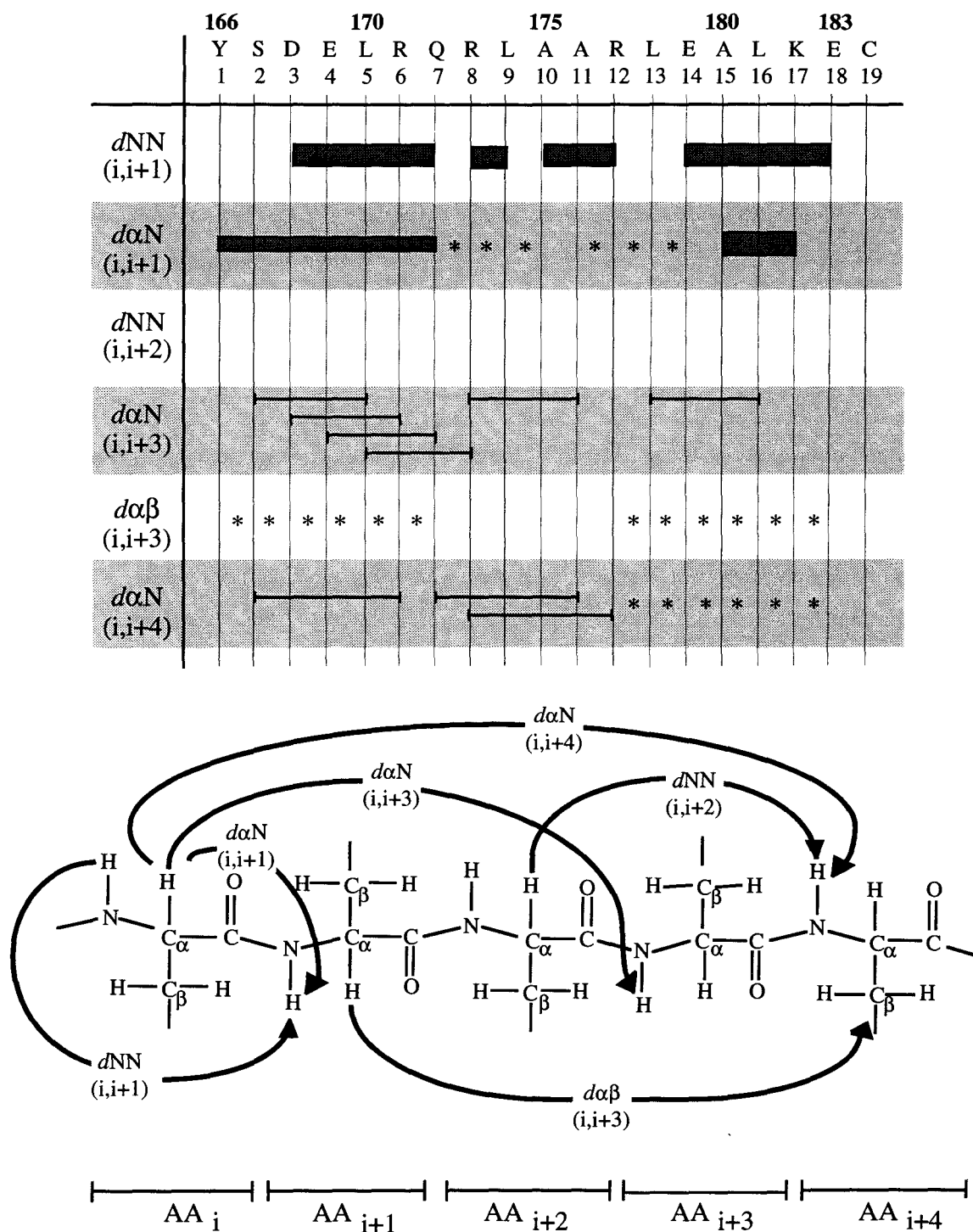


Figure 51. Contacts NOE (*nuclear Overhauser effect*) à faible distance observés sur le spectre NOESY du peptide trimère apoA-I [166-183] obtenu par ligation chimio-sélective.

- Contact NOE fort (< 0,27 nm)
- Contact NOE moyen (0,27 à 0,33 nm)
- Contact NOE faible (0,33 à 0,50 nm).

Les astérisques marquent la présence de données non exploitables pour cause de recouvrements.

L'analyse du spectre TOCSY fait apparaître l'existence d'un groupe unique de pics correspondant aux résidus des 3 fragments peptidiques 166-182 de la molécule. Ceci suggère une structure homogène en solution de ces fragments solidaires de la matrice de lysines. En revanche, elle montre des pics différents pour le résidu Glu<sub>183</sub> et la Cys des trois fragments. Il semble donc que les 3 branches du trimère présentent une structure unique, et que seuls les résidus Glu<sub>183</sub> et Cys des 3 segments subissent l'influence de la matrice. L'analyse RMN démontre donc que la polymérisation de trois peptides hélicoïdaux sur une matrice branchée asymétrique n'induit pas d'asymétrie de structuration importante au niveau des 3 branches de la construction.

Par ailleurs, l'analyse des contacts Noe inter-résidus (**Figure 51**) met en évidence des contacts  $dNN(i,i+1)$ ,  $d\alpha N(i,i+3)$  et  $d\alpha N(i,i+4)$  caractéristiques d'une structuration  $\alpha$ -hélicoïdale importante du trimère apoA-I [166-183]. L'hélicité importante du segment N-terminal du peptide, déjà observée pour le peptide seul, est à nouveau clairement montrée au sein de la construction dendrimérique. En revanche, en raison de la présence de nombreuses zones de recouvrement sur les spectres, il n'a pas été possible de mettre en évidence d'autres régions de la séquence 166-183 structurées en hélice  $\alpha$  dans le peptide dendrimérique.

## 7. DISCUSSION

L'ensemble de ce chapitre décrit une nouvelle application du concept MAP (*multiple antigenic peptides*), introduit initialement par Tam et coll.<sup>264</sup>, dans le domaine des apolipoprotéines. Ces constructions dendrimériques résultent de l'association parallèle d'un nombre défini d'une même unité structurale de l'apolipoprotéine A-I sur une matrice constituée de résidus de lysines branchées. Ce modèle présente l'avantage d'être évolutif sur plusieurs points. D'un point de vue qualitatif et compte tenu de l'existence de plusieurs types de protections temporaires orthogonales (t-Boc, Fmoc, etc.), on peut envisager des stratégies permettant la synthèse de multiples copies de plusieurs unités de répétition différentes au sein d'une même construction avec un grand choix de combinaisons spécifiques. Par ailleurs, le nombre d'unités de répétition que l'on peut greffer n'est, en théorie, pas limité et l'addition de rangs de lysines supplémentaires peut être envisagée si toutefois, leur nombre reste compatible avec les limites de la synthèse peptidique en phase solide. Dans notre étude, le choix du nombre d'unités d'études antérieures faisant état d'un nombre variable d'hélices (6, 7 ou 8) engagées par l'apoA-I dans la liaison aux lipides au sein des HDL. Il a donc été décidé de synthétiser deux types de constructions, l'une trimérique et l'autre tétramérique, constituées respectivement de trois et quatre copies de la séquence 145-183 de l'apoA-I (6 et 8 hélices théoriques) par molécule, afin de mimer le mieux possible le modèle natif. Des constructions équivalentes ont

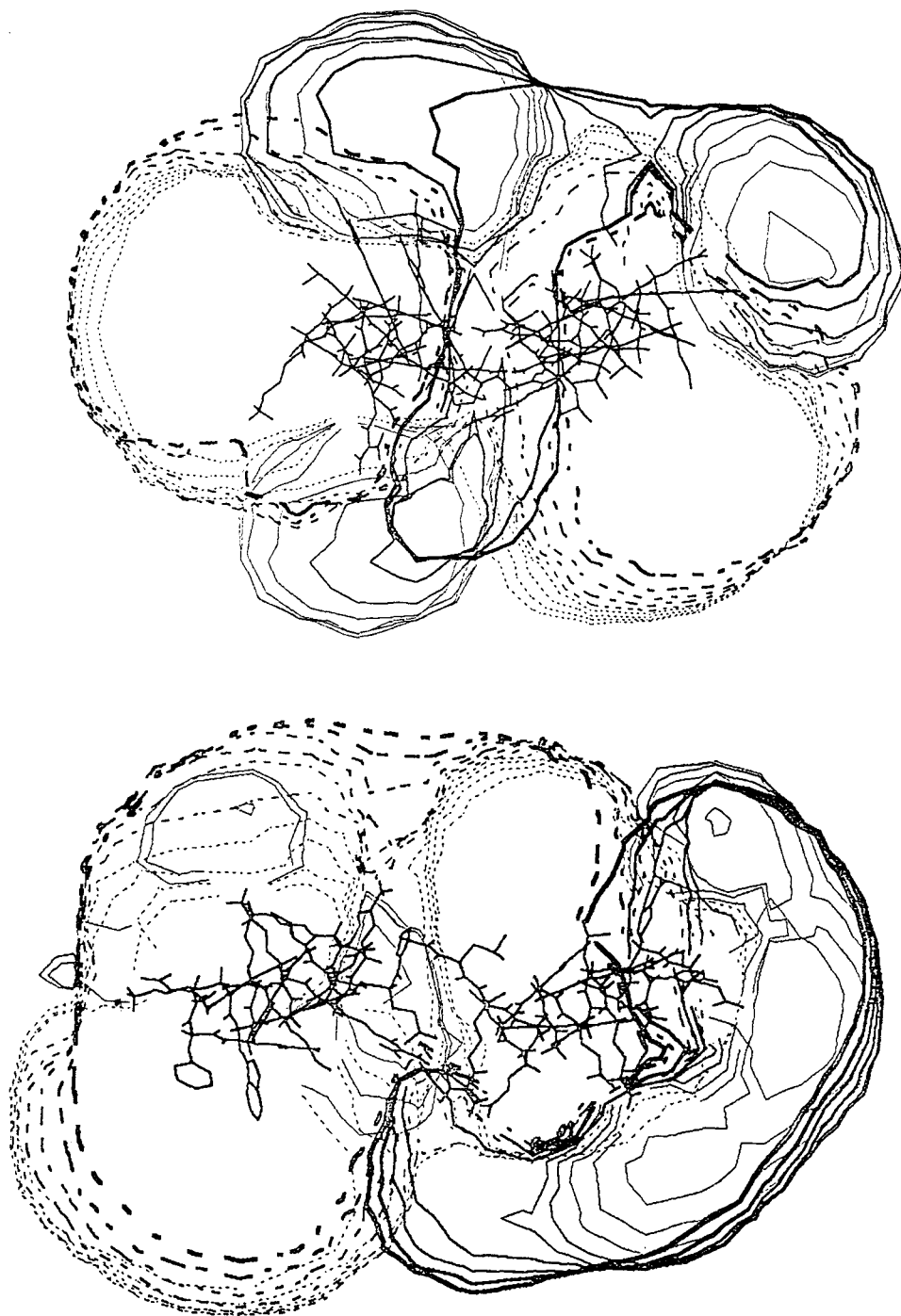
également été synthétisées avec la séquence 166-183 de l'apoA-I (3 et 4 hélices). Enfin, une construction octamérique a aussi été produite à partir de la séquence 166-183 de l'apoA-I (8 hélices).

La synthèse des peptides sur la matrice dendrimérique a été réalisée simultanément sur toutes les fonctions réactives de cette matrice. Dans ces conditions, et bien que quatre excès d'acides aminés aient été utilisés lors de chaque double couplage systématique, il est possible que quelques fonctions amines aient échappé au couplage. Afin de ne pas permettre la production de constructions présentant des séquences tronquées, les fonctions amines résiduelles n'ont pas subi de *capping* par acétylation. Cette stratégie a donc privilégié la production de molécules présentant des micro-hétérogénéités et possédant des propriétés physico-chimiques proches les unes des autres. La présence de ces sous-produits apparentés peut expliquer les hétérogénéités de taille des disques phospholipides/peptide observées en microscopie électronique.

A la fin de la synthèse, l'acétylation des fonctions amines terminales a été effectuée dans le but de permettre l'établissement d'une structuration hélicoïdale en évitant toute interaction défavorable de cette fonction ionisable avec la partie positive du macrodipôle de la première hélice<sup>250</sup>. Les fonctions carboxyliques terminales sont bloquées par leur liaison à la matrice. Comme cela avait été démontré précédemment pour l'apoA-I native<sup>142,134</sup>, les données de dichroïsme circulaire révèlent l' $\alpha$ -hélicité importante des peptides dendrimériques au sein des HDL reconstituées. Le trifluoroéthanol induit également l'hélicité des peptides dendrimériques. Les mesures de dichroïsme circulaire permettent donc d'affirmer que la structure hélicoïdale des peptides linéaires synthétisés est conservée au sein d'une molécule dendrimérique. L'incorporation du peptide apoA-I [145-183] au sein d'une telle structure semble même avoir un effet structurant supplémentaire puisque le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité du peptide linéaire reste toujours inférieur à celui mesuré dans les constructions dendrimériques dans le tampon aqueux ou dans le TFE 50%, mais également dans les HDL reconstituées. La capacité de structuration des unités de répétition de l'apoA-I au sein des constructions dendrimériques peut s'expliquer par le réarrangement des macrodipôles des hélices en position quasiment antiparallèle les uns par rapport aux autres à la périphérie des disques de phospholipides. Cette conformation assurerait ainsi une bonne stabilisation mutuelle des macrodipôles. Dans une étude très récente, Holvoet et coll.<sup>122</sup> montrent que des mutants d'apoA-I sont capables d'ajuster l'orientation de certaines de leurs hélices amphipathiques afin de rendre possible la formation de HDL reconstituées stables en présence de phospholipides. Un effet du même ordre pourrait intervenir dans les constructions dendrimériques. Une autre explication réside dans le fait que l'extrémité C-terminale de chaque fragment est ancrée sur la matrice au sein des constructions dendrimériques. La matrice branchée pourrait jouer un rôle de nucléateur d'hélice  $\alpha$ . Enfin, l'association covalente de plusieurs paires d'hélices constitue un facteur entropiquement favorable à

l'établissement d'interactions entre hélices, telles qu'elles ont été modélisées dans l'apoA-I<sup>135</sup>. Ces interactions, qui sont des facteurs stabilisants des hélices, pourraient également expliquer les résultats observés.

La caractérisation physico-chimique des complexes générés par les peptides dendrimériques montre que la construction trimérique incorporant la séquence 145-183 de l'apoA-I autorise la formation de particules HDL reconstituées possédant des propriétés physico-chimiques (composition chimique, taille, structure secondaire) proches des HDL reconstituées avec l'apoA-I entière. Toutefois, il n'a pas été possible de reproduire des particules équivalentes avec une autre séquence de l'apoA-I : la séquence 102-140. En effet, les HDL discoïdales reconstituées avec le tétramère apoA-I [102-140] présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes de celles obtenues avec la construction équivalente incluant la séquence 145-183 de l'apoA-I. Les disques formés sont plus larges et hétérogènes, et leur composition chimique radicalement différente de celle des disques préparés avec l'apoA-I native. La séquence 102-140 constitue pourtant, comme la séquence 145-183, un domaine de l'apoA-I prédit comme possédant une structure hélice-coude-hélice (**figure 38**). Toutefois, à en juger par l'étude de modélisation par MHP présentée sur la **figure 52**, cette séquence possède une amphipathicité différente de celle modélisée pour la séquence 145-183. Alors que le moment hydrophobe du segment 145-183 est dirigé perpendiculairement au plan formé par les 2 hélices, conformément à l'hypothèse de l'association de l'apoA-I aux lipides, celui du segment 102-140 apparaît dirigé parallèlement à ce même plan. Cet effet semble principalement dû au fait qu'une des 2 hélices (102-120) est globalement plus hydrophile que l'autre au sein du motif 102-140. Ce déséquilibre a d'ailleurs été confirmé très récemment par Palgunachari et coll.<sup>147</sup> par la synthèse des différentes unités 22-mer de l'apoA-I humaine. Cette étude montre que l'unité 99-120 est bien la plus hydrophile de toutes les unités présentes au sein de l'apoA-I. Le déséquilibre dans l'amphipathicité du fragment 102-140 pourrait être à l'origine des propriétés très spécifiques des particules reconstituées avec le tétramère apoA-I [102-140]. En 1984, l'équipe de Segrest<sup>89</sup> a proposé une hypothèse pour expliquer les variations de taille de disques reconstitués dans différentes conditions, mais présentant tous un nombre équivalent de molécules d'apoA-I. Un mécanisme mettrait en jeu une paire d'hélice de l'apoA-I qui serait tantôt liée (disques de grande taille) tantôt non liée aux lipides (disques de petite taille) suivant la circonférence des particules. De nombreuses études<sup>165,166,156</sup> désignent l'hélice 5 (résidus 102-120) de l'apoA-I comme appartenant à cette région de conformation variable. Il est vraisemblable qu'un tel domaine possède des propriétés d'association vis-à-vis des lipides différentes de celles des autres domaines hélicoïdaux de l'apolipoprotéine A-I. Ceci pourrait expliquer les caractéristiques physico-chimiques particulières des HDL reconstituées avec la construction tétramérique utilisant la séquence 102-140 de l'apoA-I, sortie de son contexte protéique.



**Figure 52. Visualisation du caractère amphipathique des peptides apoA-I [145-183] (en haut) et apoA-I [102-140] (en bas) par la technique des MHP mise en œuvre par le programme Tammo+.**

Pointillés : potentiel hydrophile

Lignes pleines : potentiel hydrophobe.

## 8. CONCLUSION

Les constructions dendrimériques présentées dans ce chapitre pourraient constituer une alternative intéressante à l'utilisation des peptides linéaires (qui présentent de faibles propriétés mimétiques des apolipoprotéines échangeables), et aux mutants d'apolipoprotéines (dont la production est souvent délicate et qui ne procurent qu'une information globale par rapport à la séquence). Dans un article récent, Yancey et coll.<sup>238</sup> mettent l'accent sur la nécessité de posséder un modèle peptidique contenant plusieurs segments synthétiques pour examiner plus précisément le rôle de l'apolipoprotéine A-I dans le transfert du cholestérol et des phospholipides, depuis la membrane plasmique des cellules. Les constructions dendrimériques branchées présentent les caractéristiques d'un tel modèle et ces molécules devraient permettre de compléter l'étude des relations structure/fonctions des domaines de l'apolipoprotéine A-I.

## 9. PUBLICATION

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue *"European Journal of Biochemistry"* dont voici la référence complète :

Demoor L., Boutillon C., Fievet C., Vanloo B., Baert J., Rosseneu M., Fruchart J.C., and Tartar A., (1996). Branched synthetic constructs that mimic the physico-chemical properties of apolipoprotein A-I in reconstituted high density lipoprotein. *Eur. J. Biochem.*, 239, 74-84.

## CHAPITRE V. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES HDL RECONSTITUEES AVEC LES PEPTIDES DENDRIMERIQUES

### 1. INTRODUCTION

Le chapitre précédent montre que les constructions dendrimériques, composées de plusieurs copies de la séquence 145-183 de l'apoA-I humaine, sont capables de mimer les propriétés physico-chimiques de l'apoA-I entière au sein des HDL. Dès lors, il nous a semblé logique de déterminer la capacité des constructions dendrimériques à reproduire les propriétés et fonctions biologiques de cette apolipoprotéine. Ainsi, l'immunoréactivité des constructions peptidiques au sein des HDL reconstituées a tout d'abord été étudiée. Puis, la capacité de ces complexes à interagir avec la membrane de cellules en culture (cellules Hela), ainsi que le potentiel d'activation de la LCAT des particules reconstituées avec le trimère apoA-I [145-183] ont été évaluées. Enfin, la faculté de ce type de molécule à induire un efflux de cholestérol de cellules en culture (adipocytes et hépatômes) a été mesurée.

### 2. IMMUNOREACTIVITE DES PEPTIDES SYNTHETIQUES

Pour effectuer ces études immunochimiques, nous avons utilisé les anticorps monoclonaux A44, A11, A73, A03, et A10, dont la cartographie (**Tableau 12**) est bien établie<sup>24</sup>.

**Tableau 12. Cartographie des anticorps monoclonaux A44, A11, A73, A03, A10<sup>24</sup>.**

Anticorps monoclonal	Régions reconnues dans l'apoA-I
A11	99-105 et 126-132
A03	135-140
A10	149-186
A44	149-186
A73	149-186

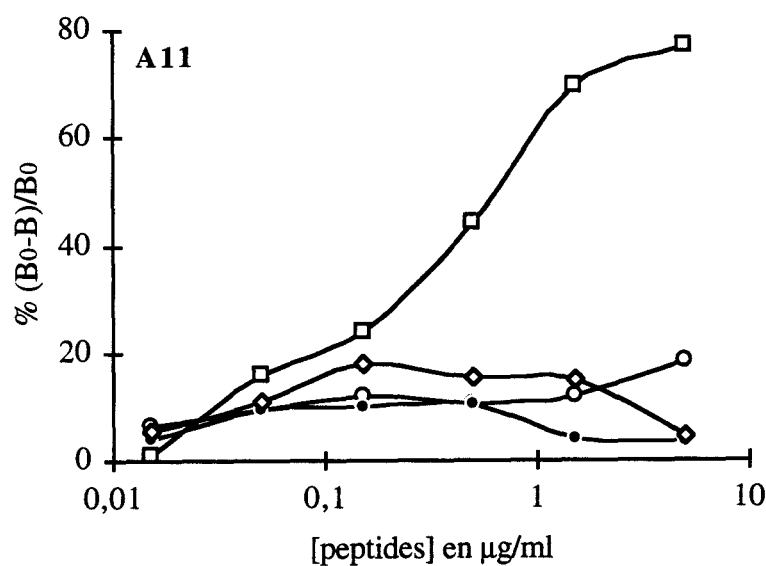
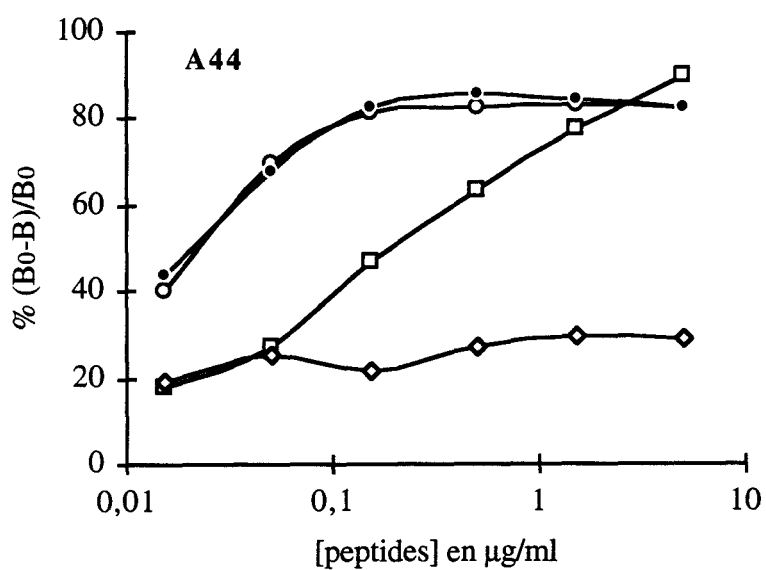
## 2.1. Etude radio-immunologique

Le principe du test radio-immunologique (RIA) que nous avons utilisé consiste à mettre en contact, en milieu liquide, une quantité définie d'anticorps monoclonal (mAb) marqué, avec des quantités croissantes d'antigènes (HDL reconstituées). Afin d'évaluer la capacité de liaison des anticorps, l'éventuel excès d'anticorps non lié est capté par un ligand (HDL<sub>3</sub>) fixé sur un support solide. Après plusieurs lavages, la mesure de la radioactivité du support permet de quantifier la capacité de liaison de l'anticorps avec les complexes phospholipides/peptide.

Les anticorps monoclonaux préalablement marqués à l'iode <sup>125</sup>I par la technique à l'iodogène (fiche technique n° 3) sont incubés à la concentration de 2 µg/ml en présence de complexes DMPC/peptide. La quantité d'anticorps marqués, non associés, est mesurée par application du mélange sur des HDL<sub>3</sub> immobilisées sur une plaque de micro-titration à la concentration de 20 µg/ml. Après plusieurs lavages, les puits en matière plastique sont découpés puis comptés au compteur à scintillation liquide. En l'absence de peptides dans le milieu d'incubation, tous les anticorps marqués se fixent sur la plaque et l'on obtient alors la fixation maximale B<sub>0</sub>. En revanche, en présence de l'antigène, les anticorps qui se fixent en milieu liquide ne sont plus disponibles pour la fixation au HDL<sub>3</sub> sur le support. Nous avons donc mesuré dans chaque puits, la fixation B<sub>C</sub> caractéristique de la concentration en antigène C utilisée. Il est alors facile de calculer, la quantité d'anticorps associé à l'antigène pour la concentration C de peptide  $[(B_0 - B_C)/A_S]$  en connaissant l'activité spécifique A<sub>S</sub> de la solution d'anticorps marqués utilisée ou encore le pourcentage de fixation  $[(B_0 - B_C)/B_0 \times 100]$ . En traçant le pourcentage de fixation en fonction de la concentration d'antigène utilisée, une courbe caractéristique de la réactivité de l'anticorps considéré vis-à-vis de l'antigène choisi est obtenue.

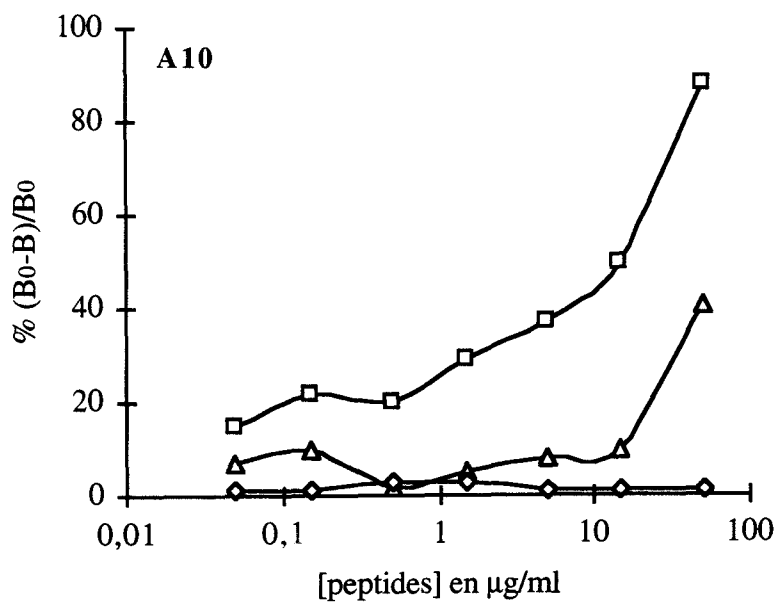
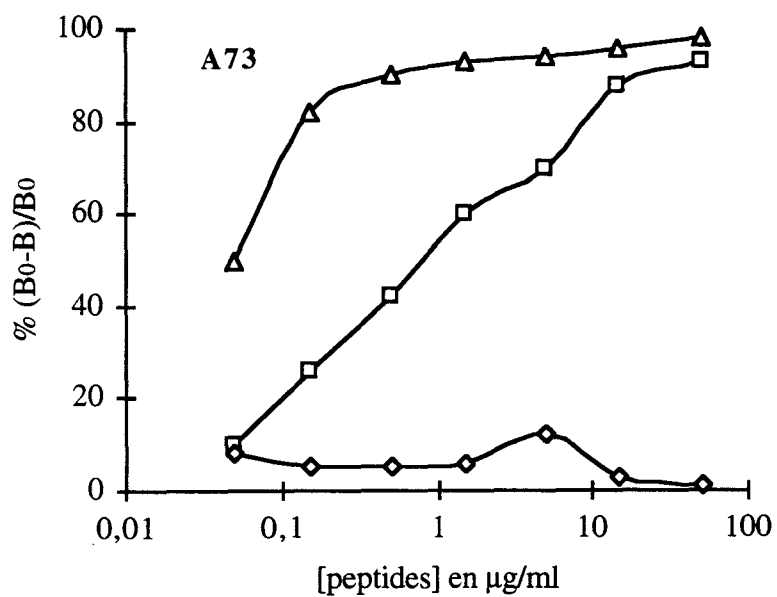
Les **figures 53 et 54**, représentent la réactivité des anticorps monoclonaux A44, A11, A73 et A10 vis-à-vis de HDL reconstituées avec l'apoA-I, d'une part, et les peptides dendrimériques, d'autre part. On peut observer que les peptides trimère et tétramère apoA-I [145-183] sont bien reconnus par l'anticorps A44 (**Figure 53**) qui est spécifique de la région comprenant les résidus 149-183 de l'apoA-I. Cet anticorps monoclonal est très réactif vis-à-vis de ces deux constructions. Il est même plus réactif qu'avec les complexes DMPC/apoA-I. Les deux constructions ne sont, en revanche, pas reconnues par l'anticorps A11 (**Figure 54**) qui est spécifique de l'épitope discontinu comprenant les régions 99-105/ 126-132 de l'apoA-I humaine.





- DMPC/apoA-I
- DMPC/tétramère apoA-I [145-183]
- DMPC/trimère apoA-I [145-183]
- ◇— DMPC/tétramère apoA-I [102-140]

Figure 53. Réactivité des anticorps A44 (spécifique de la région 149-186 de l'apoA-I) et A11 (spécifique des régions 99-105 et 126-132 de l'apoA-I) vis-à-vis de HDL discoïdales reconstituées.



- DMPC/apoA-I
- △— DMPC/tétramère apoA-I [145-183]
- ◇— DMPC/tétramère apoA-I [102-140]

**Figure 54. Réactivité des anticorps A73 et A10 (spécifiques de la région 149-186 de l'apoA-I) vis-à-vis de HDL discoïdales reconstituées.**

Pour confirmer ce résultat, les constructions tétramériques ont été testées vis-à-vis de deux autres anticorps (A73 et A10) qui reconnaissent également l'épitope 149-186 de l'apoA-I (**figure 54**). La réactivité de l'anticorps A73 vis-à-vis des complexes DMPC/tétramère apoA-I [145-183] est identique à celle obtenue avec l'A44. En revanche, l'A10 qui reconnaît faiblement les complexes DMPC/apoA-I ne reconnaît pas le tétramère apoA-I [145-183]. On sait pourtant que l'anticorps monoclonal A10 présente une affinité importante<sup>20</sup> pour les HDL<sub>3</sub>. La réactivité limitée de l'A10 pour les complexes DMPC/apoA-I peut s'expliquer par une expression différente de l'épitope 149-186 de l'apoA-I dans les HDL reconstituées discoïdales et dans les HDL<sub>3</sub>. Il n'y a quasiment pas de reconnaissance du tétramère apoA-I [145-183] par l'A10. Ceci peut s'expliquer par le fait que les segments apoA-I [145-183] des constructions dendrimériques présentent une conformation plus proche de celle adoptée par l'apoA-I dans les HDL reconstituées DMPC/apoA-I que de celle de l'apoA-I au sein des HDL<sub>3</sub>. Ce résultat rend compte de la complexité de l'organisation structurale de l'apoA-I qui est différente suivant le type de particule considéré.

L'immunoréactivité des HDL reconstituées avec le DMPC et le tétramère apoA-I [102-140] a également été testée. Le fait que l'anticorps monoclonal A11 ne reconnaisse pas cette construction au sein des HDL (**figure 53**) constitue un résultat surprenant compte tenu du fait que cet anticorps est spécifique de l'épitope discontinu 99-105/126-132. Il est possible que les 3 premiers acides aminés (99-101) soient indispensables à la fixation de l'anticorps sur l'épitope ou encore que la structure de l'extrémité N-terminale de la séquence 102-140 soit différente au sein de la construction peptidique et au sein de la protéine native. Par ailleurs, aucun anticorps monoclonal spécifique de la séquence 149-185 (A44, A73, A10) ne reconnaît la séquence 102-140 dendrimérisée. Ce résultat confirme la spécificité de ces 3 anticorps monoclonaux pour la séquence 149-186 de l'apoA-I humaine.

## 2.2. Approche par la technique BIAcore

L'analyse de l'interaction bio-spécifique en temps réel (BIA) est une technologie récente qui s'applique remarquablement bien à l'étude des interactions moléculaires du type antigène/anticorps. Cette technologie complexe met en jeu une propriété optique appelée *Surface Plasmon Resonance* qui permet de suivre des interactions entre bio-molécules. Cette technologie a pu être utilisée dans cette étude grâce à la collaboration mise en place entre le SERLIA et la société Rhône-Poulenc Rorer dans le cadre du programme BIOAVENIR.

Le système BIACORE se compose :

- d'une puce servant de senseur liée à un système optique.
- d'une cartouche micro-capillaire intégrée transportant les échantillons jusqu'au senseur.
- d'un système d'échantillonnage automatique.

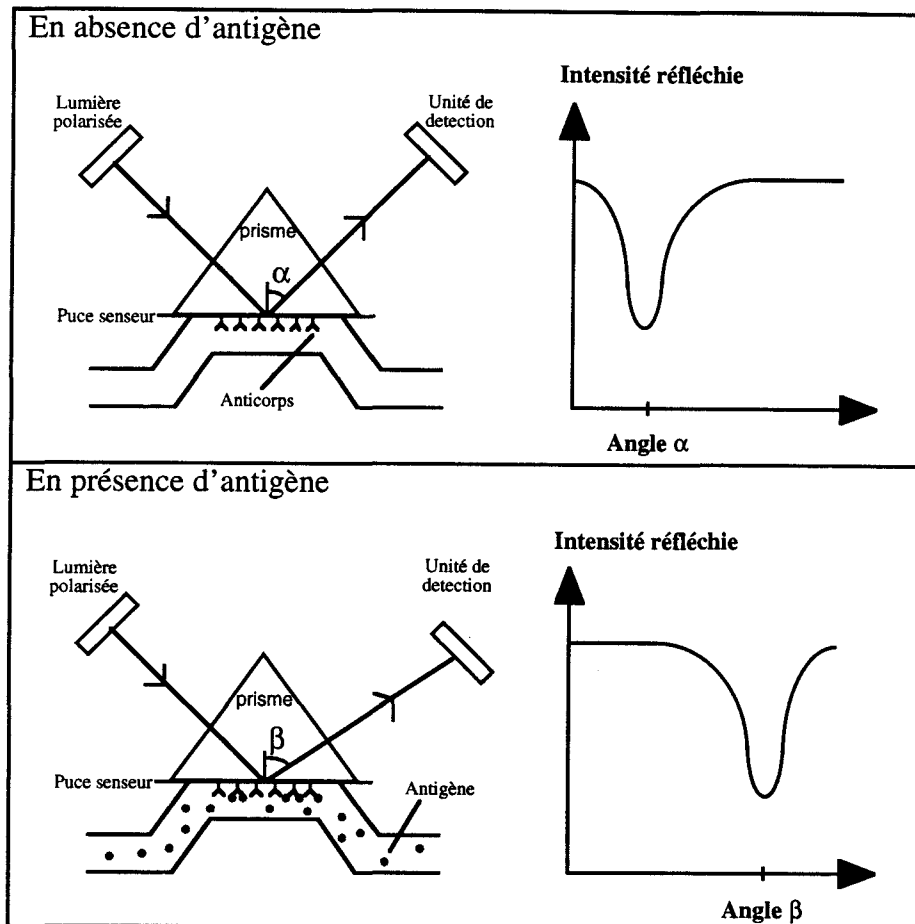
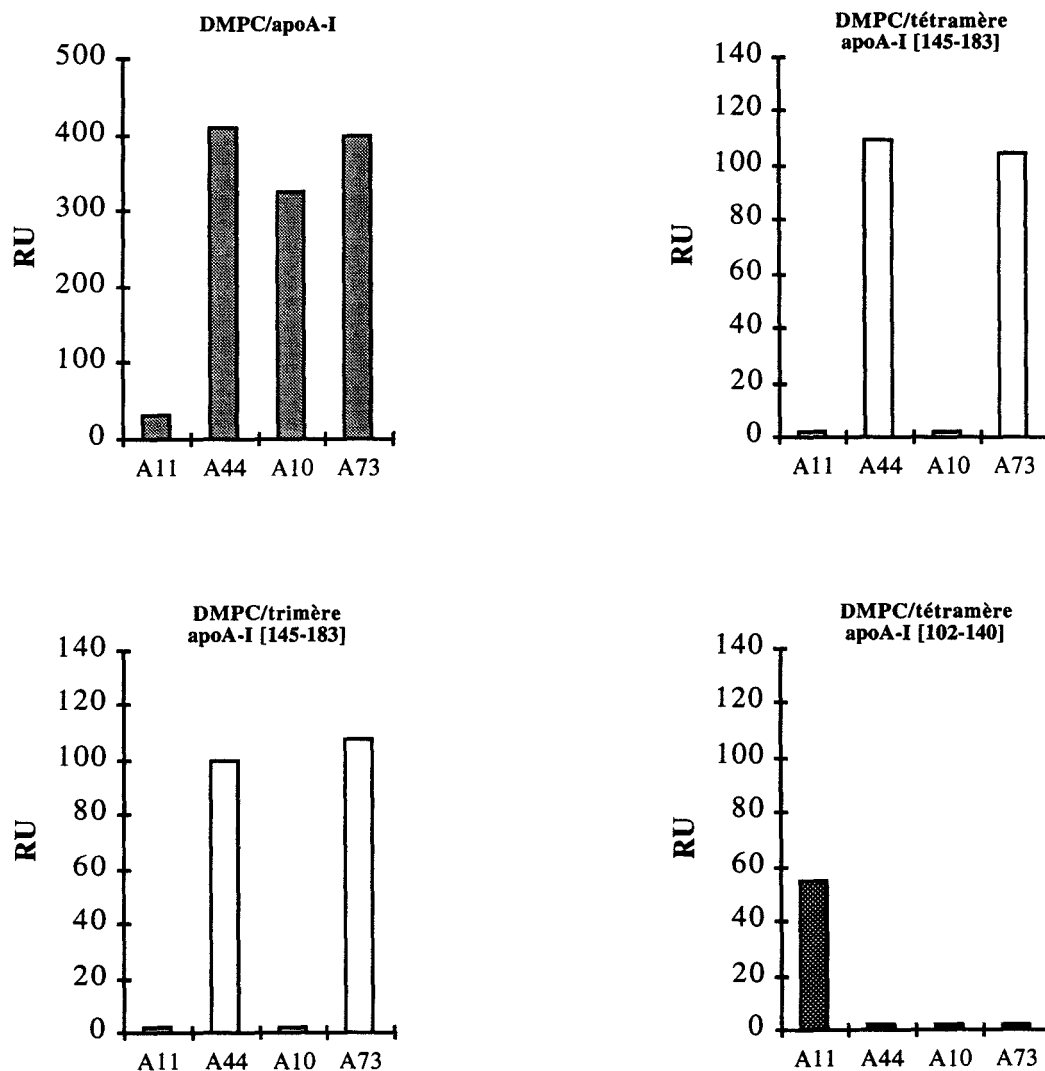


Figure 55. Principe du système BIACORE.

Le principe du système BIACORE (Pharmacia Biosensor, Upsala, Suède) est décrit sur la figure 55. Sur la partie inférieure de la puce senseur, un polymère de type dextran permet l'immobilisation de l'anticorps monoclonal à étudier. En l'absence d'antigène, un faisceau incident de lumière polarisée, envoyé sur l'autre face de la puce, est réfléchi par le prisme avec une intensité minimale selon l'angle  $\alpha$ . En présence d'antigène, la variation de masse moléculaire et l'effet de concentration engendrés par la fixation entraînent une modification de l'indice de réfraction du milieu. Cette modification déplace le minimum d'intensité du faisceau

réfléchi selon un angle  $\beta$  caractéristique de la liaison antigène/anticorps. Ce phénomène porte le nom de *Surface Plasmon Résonance* (SPR) qui est ici exprimé à l'aide d'une unité arbitraire : le RU. Plus la réactivité de l'anticorps pour l'antigène est grande, plus l'intensité de la résonance, exprimée en RU, est importante. Cette technique présente l'avantage majeur de constituer une mesure en temps réel de la reconnaissance antigène/anticorps, ce qui permet de travailler sur des molécules non marquées, et ceci avec une extrême sensibilité.



**Figure 56.** Réactivité des anticorps A11 (spécifique des régions 99-105 et 126-132 de l'apoA-I), A44, A10, et A73 (spécifiques de la région 149-186 de l'apoA-I) vis-à-vis de HDL discoïdales reconstituées, mesurée à l'aide de la technique BIACORE (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Suède). Les intensités RU (*Resonance Unit*) ne sont comparables que pour un même antigène.

Quatre anticorps monoclonaux ont été testés A44, A73, A10 et A11 vis-à-vis de différents complexes reconstitués (DMPC/apoA-I, DMPC/tétramère apoA-I [145-183], DMPC/trimère apoA-I [145-183], et DMPC/tétramère apoA-I [102-140]). Les résultats sont présentés sur la **figure 56**. Les résultats obtenus avec les complexes DMPC/apoA-I confirment ceux obtenus en RIA. En effet, les 3 anticorps A44, A10 et A73 reconnaissent très bien les complexes DMPC/A-I. En revanche, une réactivité plus faible de l'A11 pour ces complexes a été mise en évidence. Les HDL reconstituées avec les dendrimères apoA-I [145-183] sont reconnus par l'A44 et l'A73, tandis que l'A10 ne reconnaît toujours pas ces constructions. Contrairement à ce qui était observé en RIA, l'anticorps monoclonal A11, spécifique de la région 99-105/126-132 de l'apoA-I, reconnaît ici le tétramère apoA-I [102-140]. Cette observation est probablement due à la sensibilité plus importante de la méthode BIACORE. A l'inverse, le tétramère apoA-I [102-140] n'est toujours pas reconnu par les anticorps A44, A73, A10 spécifiques de l'épitope 149-183 de l'apoA-I humaine.

### **3. CAPACITE DE FIXATION AUX CELLULE HeLa**

#### **3.1. Le modèle cellulaire HeLa**

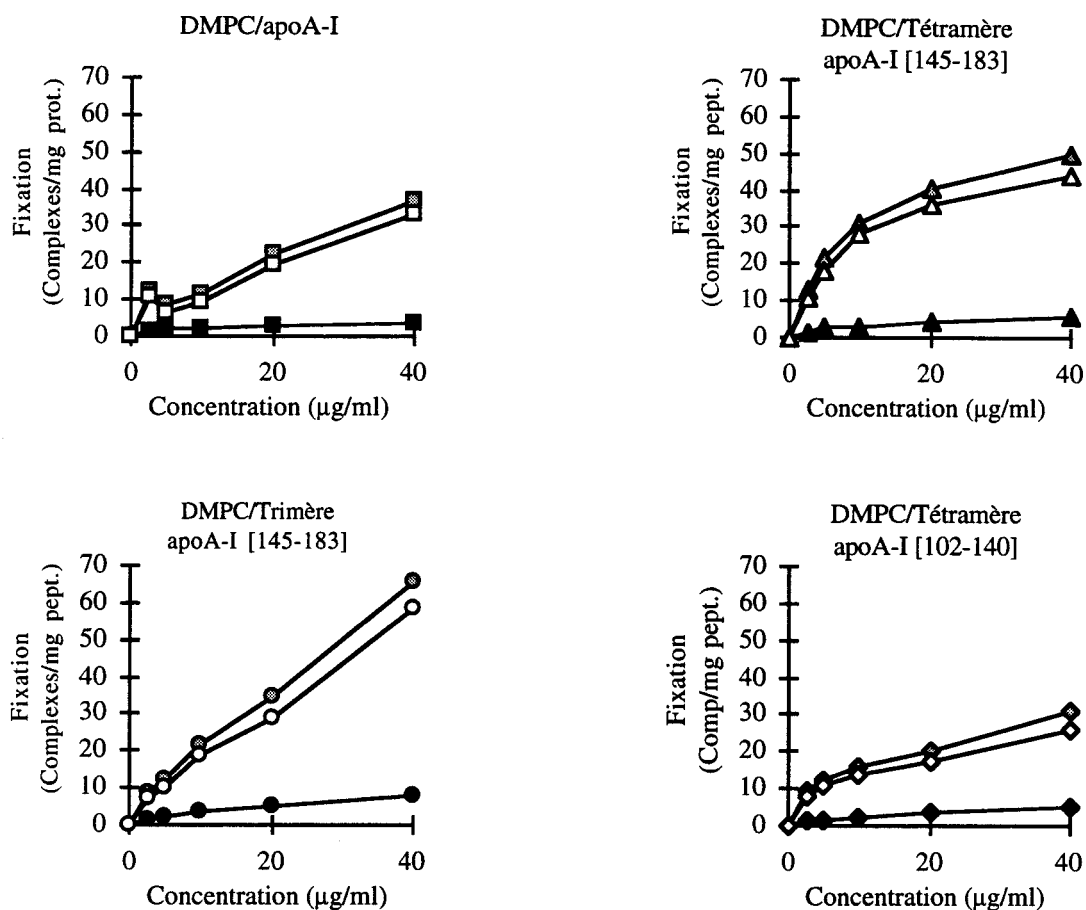
Le modèle cellulaire utilisé pour évaluer la capacité de fixation des HDL reconstituées avec les peptides dendrimériques est le modèle HeLa. Les cellules HeLa constituent une lignée cellulaire d'épithélium humain provenant d'un carcinome du col de l'utérus<sup>270</sup>. Cette lignée est utilisée dans le laboratoire comme modèle de cellules périphériques<sup>20</sup>. Elles possèdent un taux de croissance rapide et ne nécessitent pas de conditions de culture particulières.

La culture des cellules HeLa est largement documentée dans la fiche technique N° 5 . Brièvement, les cellules sont mises en culture sur un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 10% (en volume) de sérum de veau foetal (fiche technique N° 4). Lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules sont trypsinées etensemencées sur une surface plus importante. Après une autre confluence, elles sontensemencées sur des plaques de 16 puits (Ø : 3,5 cm par puits) et sont prêtes à être utilisées lors d'une nouvelle confluence au bout de 48 heures environ.

#### **3.2. Etude de la fixation des HDL reconstituées sur cellules HeLa**

Ce type d'expérience permet d'estimer la capacité d'un ligand à se fixer de façon spécifique sur la membrane d'une cellule. Les plaques multi-puits dans lesquelles sont cultivées

les cellules, sont mises en contact avec des ligands marqués et sont incubées à 4°C. L'incubation à basse température permet de ne mesurer que la fixation et non la résultante d'un phénomène dynamique plus complexe : fixation + internalisation (fiche technique N° 5).



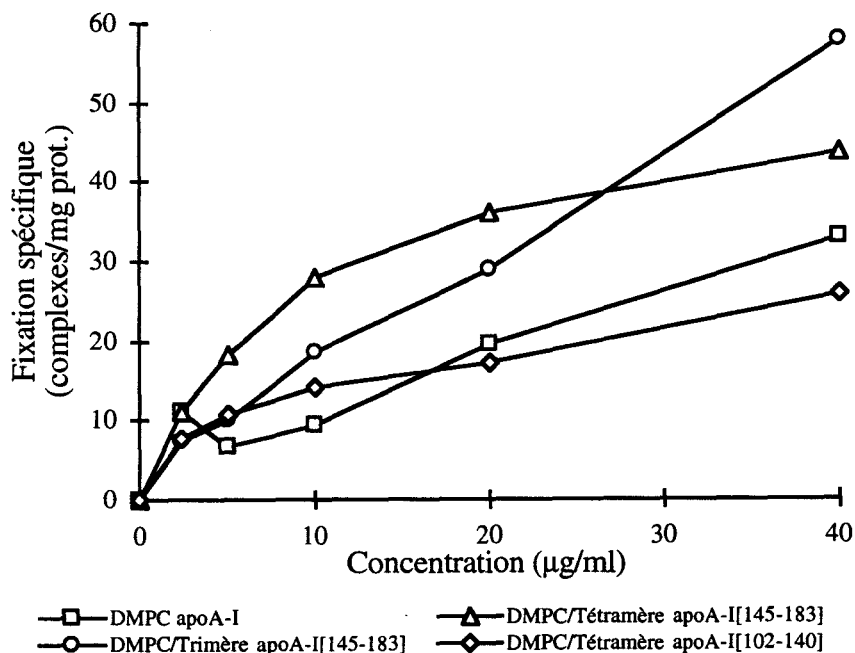
**Figure 57. Fixation directe à 4°C de HDL reconstituées et marquées, sur cellules HeLa.**

Les points grisés correspondent à la fixation totale, les points noirs à la fixation non spécifique évaluée en présence d'un excès de ligand froid, les points blancs correspondent à la fixation spécifique résultante de la soustraction de la fixation totale par la fixation non spécifique. La fixation est exprimée en nombre de complexes fixés par mg de protéines cellulaires.

La capacité de fixation des complexes par les cellules HeLa peut être appréciée par des mesures directes (**figure 57**). Dans cette expérience, la capacité de fixation à 4°C de complexes radio-marqués a été directement mesurée sur les cellules. Dans ce but, les différentes HDL reconstituées ont été marquées à l'iode  $^{125}\text{I}$  par la technique à l'iodogène (fiche technique N° 3). L'activité spécifique a été évaluée en mesurant la radioactivité de l'échantillon d'une part, et la

concentration en peptide ou protéine au moyen d'un dosage de Lowry simplifié par Petersen<sup>271</sup>. La fixation non-spécifique des complexes a été mesurée en présence d'un excès de ligand froid. La soustraction de cette valeur de la fixation totale mesurée permet d'évaluer la composante spécifique de la fixation des complexes sur les cellules.

La comparaison des fixations spécifiques des différents complexes (**figure 58**) montre la capacité importante de fixation sur cellules HeLa des HDL reconstituées avec l'apoA-I native. Cette fixation est saturable et la proportion de fixation non spécifique est très faible (10% à 40 µg de DMPC/A-I par ml). Les peptides dendrimériques apoA-I [145-183] sont également capables de se fixer spécifiquement sur les cellules HeLa. La fixation directe met par ailleurs en évidence une capacité de fixation moins importante des complexes DMPC/tétramère apoA-I [102-140] sur les cellules HeLa.



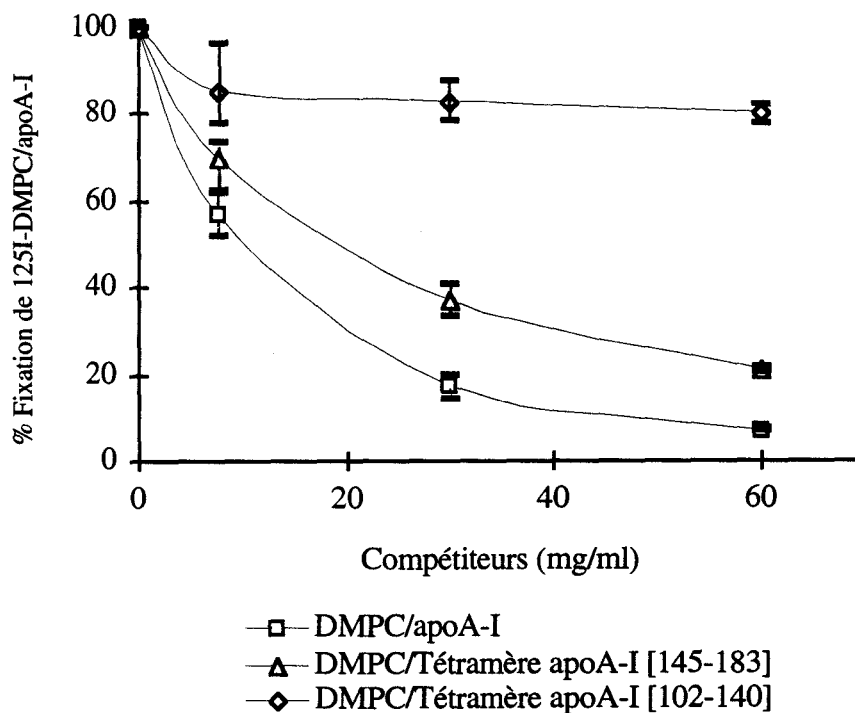
**Figure 58. Comparaison de la fixation spécifique à 4°C sur cellules HeLa de HDL reconstituées marquées.**

Chaque point est obtenu en établissant la moyenne de 3 mesures expérimentales. La fixation est exprimée en nombre de complexes fixés par mg de protéines cellulaires.

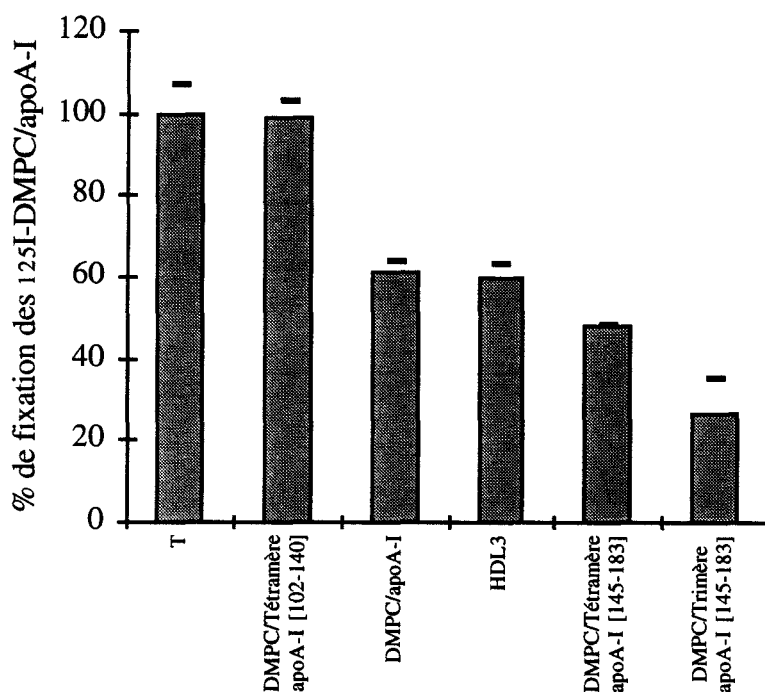
Il est également possible de mesurer la capacité des cellules à fixer les complexes en effectuant des compétitions entre des complexes marqués et des complexes non marqués. Dans notre étude, c'est la capacité des complexes à déplacer l'équilibre de fixation de complexes DMPC/apoA-I marqués qui a été mesurée. La **figure 59** représente une courbe de compétition



de la fixation réalisée à 4°C sur des cellules HeLa entre, d'une part, des complexes  $^{125}\text{I}$ -DMPC/apoA-I (7,5  $\mu\text{g}$  de protéines par ml) et, d'autre part, des complexes non marqués (DMPC/apoA-I, DMPC/tétramère apoA-I [145-183] et DMPC/tétramère apoA-I [102-140]) utilisés à différentes concentrations. La **figure 60** est un histogramme rendant compte d'une autre expérience de compétition effectuée à 4°C entre des complexes  $^{125}\text{I}$ -DMPC/apoA-I (5  $\mu\text{g}$  de protéine par ml) et des complexes non marqués (HDL<sub>3</sub>, DMPC/apoA-I, DMPC/trimère apoA-I [145-183], DMPC/tétramère apoA-I [145-183] et DMPC/tétramère apoA-I [102-140]) à concentration constante (5  $\mu\text{g}$  de protéine par ml). Les HDL<sub>3</sub> ont été isolées d'un plasma par ultracentrifugation séquentielle ( $1,12 < d < 1,21$ ). L'absence d'apo E a été contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et seules les HDL<sub>3</sub> ne contenant pas d'apo E ont été utilisées pour les expériences de fixation, afin d'éviter toute interférence avec le récepteur LDL des cellules HeLa.



**Figure 59.** Compétition pour la fixation sur cellules HeLa de  $^{125}\text{I}$ -DMPC/apoA-I (7,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), d'une part, et de HDL reconstituées soit avec l'apoA-I, soit avec les peptides dendrimériques, à différentes concentrations, d'autre part. Chaque point est obtenu par la moyenne de 3 mesures et les écarts types sont indiqués.



**Figure 60.** Compétition pour la fixation sur cellules HeLa de <sup>125</sup>I-DMPC/A-I (5 µg/ml) par des HDL reconstituées (5 µg/ml). Chaque point est obtenu par la moyenne de 3 mesures et les écarts types sont indiqués.

Sur les **figures 59 et 60**, le 100% correspond à la valeur de radioactivité des complexes <sup>125</sup>I-DMPC/apoA-I fixés sur les cellules, mesurée en absence de compétiteurs. Les deux expériences montrent que les complexes DMPC/apoA-I entrent en compétition avec eux même pour la fixation sur les cellules HeLa. Les HDL<sub>3</sub> sont également capables de déplacer les complexes <sup>125</sup>I-DMPC/apoA-I fixés sur les cellules. Les constructions dendrimériques synthétisées à partir de la séquence 145-183 de l'apoA-I entrent aussi en compétition avec les complexes <sup>125</sup>I-DMPC/apoA-I sur les cellules HeLa. La capacité de fixation des HDL reconstituées avec les peptides dendrimériques sur ces cellules est importante et c'est le trimère apoA-I [145-183] qui possède le potentiel de fixation le plus important (**figure 60**). En revanche, la construction tétramérique générée avec la séquence 102-140 de l'apoA-I n'entre pas en compétition avec les <sup>125</sup>I-DMPC/apoA-I pour la fixation sur les cellules HeLa.

#### 4. EFFLUX DE CHOLESTEROL

Il a été démontré que les HDL sont capables d'induire un efflux de cholestérol des cellules extra-hépatiques<sup>36</sup>. Cette propriété des HDL constitue la première étape du transport inverse du cholestérol des cellules périphériques vers le foie. Il nous a semblé intéressant de savoir si les

HDL reconstituées avec les constructions dendrimériques étaient capables d'induire, elles aussi, cet efflux de cholestérol.

#### 4.1. Modèles cellulaires

La capacité des HDL reconstituées avec les peptides dendrimériques à induire un efflux de cholestérol a été évalué *in vitro* sur 2 modèles cellulaires distincts :

- la lignée adipocytaire (OB1771)<sup>272</sup> provenant de testicules de souris obèses
- la lignée d'hépatomes de rats (FU5AH)<sup>273</sup>

Les cellules adipocytaires constituent un modèle de cellule d'origine véritablement périphérique. Cependant, elles présentent les inconvénients de se différencier très lentement et de donner un efflux peu important et parfois difficilement reproductible. Elles sontensemencées à raison de 20000 cellules par puits (Ø : 35 mm), dans un milieu DMEM contenant 10% (en volume) de sérum de veau foetal, de la pénicilline (200 U/ml), de la biotine (33 µM) et du panthoténate (17 µM). Après confluence et ajout du milieu de différenciation contenant de l'insuline (14 µM), de la triiodothyronine (2 nM) et de la guanyl hydrazone (10 µM), les cellules mettent 10 à 14 jours pour se différencier.

Bien que leur origine soit hépatique, les cellules FU5AH ne produisent pas de quantités significatives de lipoprotéines ou de sels biliaires. Leur métabolisme du cholestérol cellulaire a fait l'objet de nombreuses études<sup>274,275</sup> et elles se sont avérées constituer un excellent modèle pour étudier l'efflux de cholestérol cellulaire. Cette lignée est d'ailleurs maintenant considérée comme le modèle de référence en la matière. Les cellules FU5AH sont cultivées suivant le protocole décrit sur la fiche technique N°6. Pour réaliser les études d'efflux de cholestérol, les cellules sontensemencées à raison de  $8 \times 10^4$  cellules par puits (Ø 35 mm).

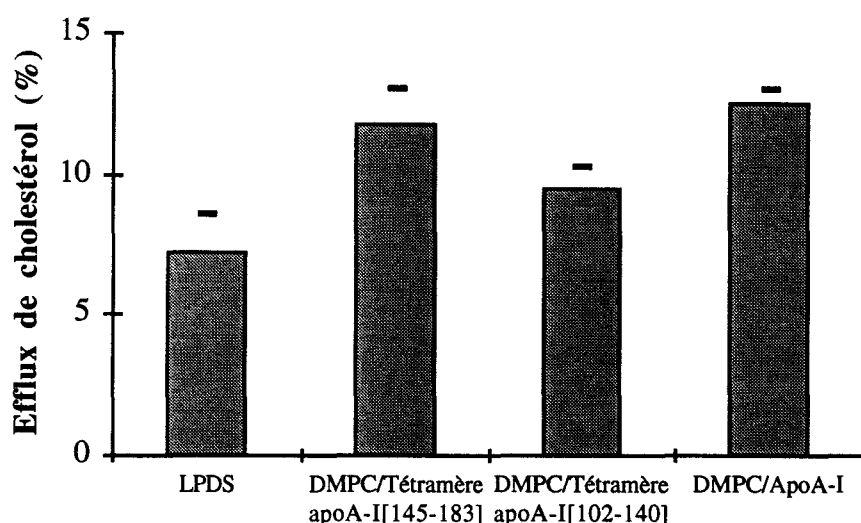
#### 4.2. Efflux de cholestérol

Une pré-charge des cellules est assurée par des LDL contenant du cholestérol marqué au tritium (fiche technique N°6). Pour cela, les cellules sont mises en contact dans un premier temps avec du milieu DMEM contenant du LPDS (sérum sans lipoprotéines) pendant 48 heures, puis les LDL contenant le cholestérol tritié sont incorporées dans le milieu. Après 48 heures de charge et plusieurs lavages, les cellules sont prêtes pour les expériences d'efflux. Elles sont alors mises en contact avec différentes HDL reconstituées dans un milieu contenant 5% de LPDS pendant 0, 2, 3 ou 4 heures à température physiologique. L'incubation des particules

peut se faire à concentration constante en protéine (ou peptide) ou à concentration constante en phospholipides. Après incubation, le milieu est récupéré, et centrifugé pour éliminer les cellules mortes. Les cellules fixées sont récupérées et la radioactivité du  $^3\text{H}$ -cholestérol (intra- et extra-cellulaire) est mesurée au compteur à scintillation liquide.

L'efflux de cholestérol correspond au pourcentage de cholestérol extra-cellulaire exprimé par rapport au cholestérol total (intra- et extra-cellulaire) :

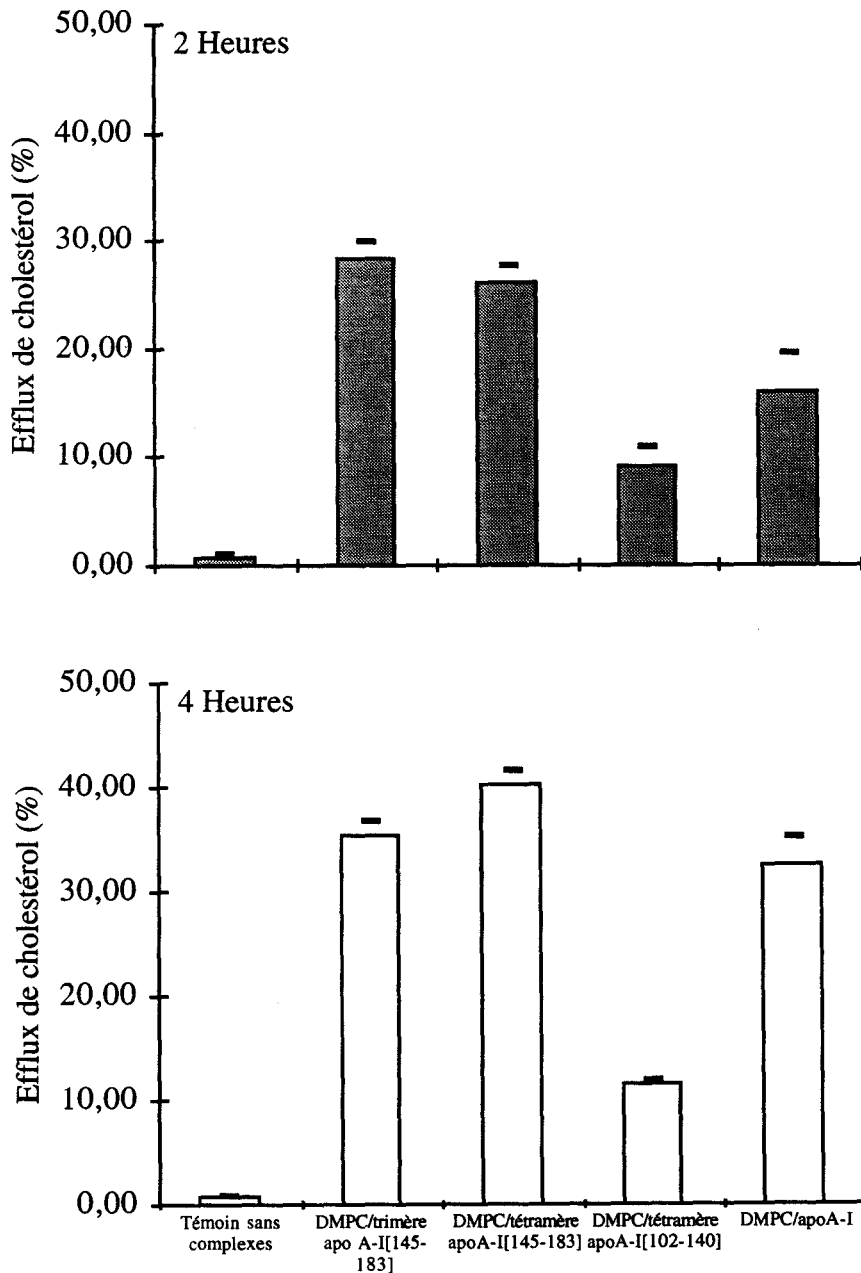
$$\% \text{ Efflux} = \frac{{}^3\text{H milieu} \times 10^2}{{}^3\text{H milieu} + {}^3\text{H cellules}}$$



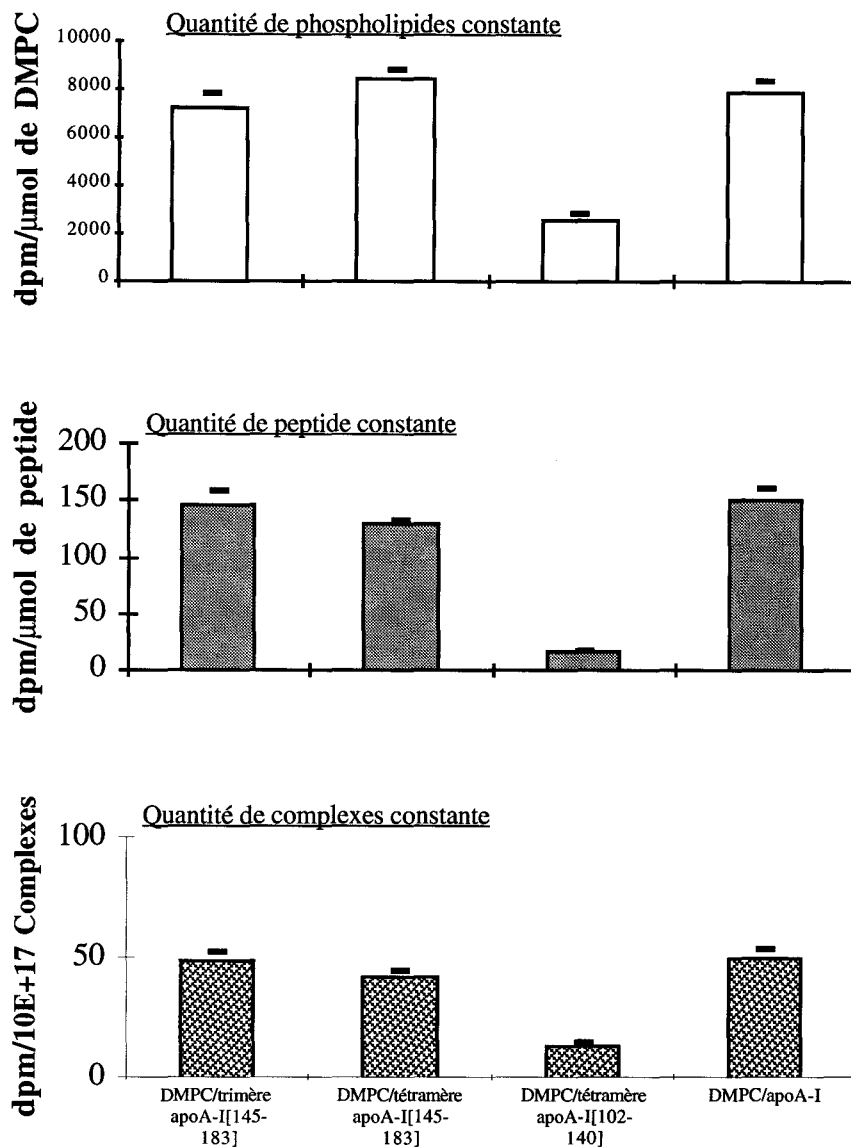
**Figure 61.** Pourcentage d'efflux de  $^3\text{H}$ -cholestérol de cellules adipocytaires (Ob1771) incubées à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 3 heures, avec différentes HDL reconstituées, à concentration constante en protéine ou peptide ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Chaque point est obtenu par la moyenne de 3 mesures et les écarts types sont indiqués.

La **figure 61** représente le pourcentage d'efflux après 3 heures d'incubation sur cellules adipocytaires induit par des complexes DMPC/peptides purifiés, à concentration constante en protéine ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Cette expérience montre qu'un efflux de cholestérol important (11,8%) est provoqué par les HDL reconstituées avec le tétramère apoA-I [145-183]. Cet efflux est comparable à celui induit par les complexes DMPC/apoA-I (12,5%). En revanche, les particules reconstituées avec le tétramère apoA-I [102-140] donne naissance à un efflux moins important (9,5%). Cependant, il convient de relativiser ces résultats car le témoin LPDS (sérum sans

lipoprotéines) induit lui aussi un efflux de cholestérol non négligeable (7,2%). La présence de ce bruit de fond important n'ayant pas permis de tirer de conclusion précise, une autre expérience d'efflux a été mise en oeuvre sur le modèle FU5AH, après 2 et 4 heures d'incubation. Les résultats sont présentés sur la **figure 62**.



**Figure 62.** Pourcentage d'efflux de  $^3\text{H}$ -cholestérol de cellules FU5AH incubées à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 2 et 4 heures, avec différentes HDL reconstituées, à concentration constante en phospholipides ( $100 \mu\text{g/ml}$ ). Chaque point est obtenu par la moyenne de 3 mesures et les écarts types sont indiqués.



**Figure 63.** Nombre de désintégrations par minute (dpm) comptabilisées sur le milieu extracellulaire après 4 heures d'incubation des cellules FU5AH chargées en cholestérol tritié, en présence de différentes HDL reconstituées. Les dpm sont normalisées en phospholipides, en peptide ou protéine, ou en nombre de complexes. Les écarts types sont indiqués.

Quel que soit le temps d'incubation, le témoin négatif (LPDS) ne provoque qu'un efflux négligeable (<1%) pour ce modèle cellulaire. On constate que les peptides tétramériques et trimériques construits avec la séquence 145-183 de l'apoA-I induisent des efflux de cholestérol importants (respectivement 26 et 28%), après deux heures d'incubation. Ces efflux sont significativement supérieurs à celui provoqué par les particules DMPC/apoA-I reconstituées (16%). En revanche, le tétramère apoA-I [102-140] n'induit qu'un efflux limité (9%). Entre

deux heures et quatre heures d'incubation, les efflux induits par les constructions apoA-I [145-183] trimériques et tétramériques augmentent pour atteindre, au bout de quatre heures, les valeurs respectives de 35 et 40%. Ces efflux à quatre heures sont comparables à celui provoqué par les particules DMPC/apoA-I (32,5%). Après quatre heures, l'efflux induit par le tétramère apoA-I [102-140] reste très inférieur (11,5%) à celui provoqué par les autres types de particules. L'expérience précédente a été réalisée avec un taux de phospholipides constant (100 µg/puits). Le nombre de désintégrations du tritium par minute dans le milieu extracellulaire, après quatre heures d'incubation, a été normalisé en fonction de la quantité de phospholipides, de peptide, ou de complexes. Les résultats obtenus peuvent être comparés sur la **figure 62**. Que l'on prenne en considération la quantité de phospholipides, la quantité de peptide ou encore celle de complexes incubés, les HDL reconstituées avec le tétramère apoA-I [102-140] constituent toujours les particules qui induisent le moins d'efflux de cholestérol des cellules FU5AH. En effet, l'efflux de cholestérol produit par ces particules n'excède jamais 30% de l'efflux obtenu avec les autres particules, et ce, quelle que soit la référence utilisée. Toutes les autres particules, DMPC/apoA-I ou DMPC/dendrimères apoA-I [145-183], engendrent des efflux globalement comparables, après quatre heures d'incubation.

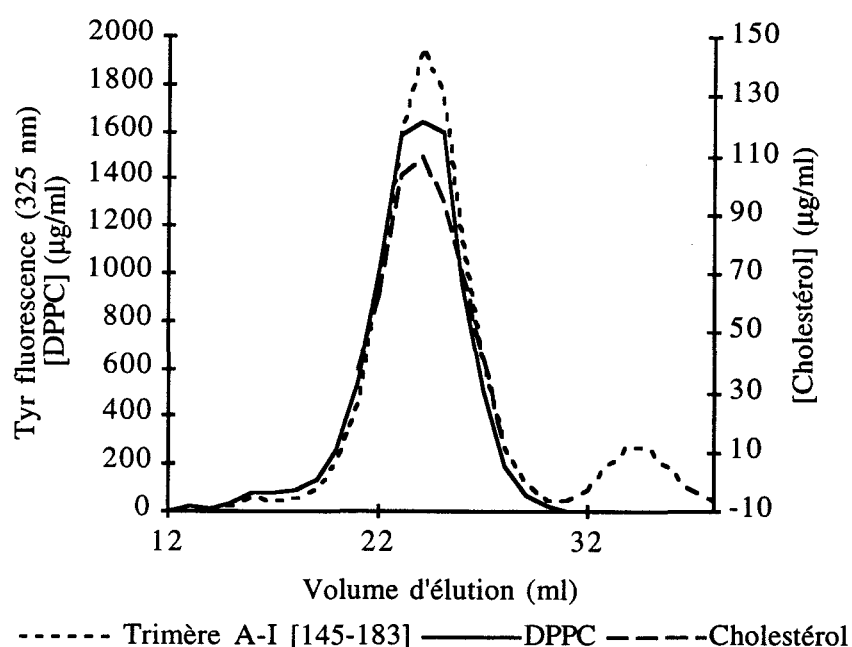
## **5. ACTIVATION DE LA LCAT.**

Bien que l'apo E ou encore l'apoA-IV puissent activer la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), l'apoA-I constitue l'apolipoprotéine activatrice majeure de cette enzyme<sup>43</sup>. La LCAT (EC 2.3.1.43) agit sur les HDL sphériques et discoïdales en transférant le groupe acyl en position 2- des lécithines ou des phosphatidyl-éthanolamines vers la fonction alcool libre des stérols, en particulier du cholestérol, afin de générer des esters de stérols (retenus à l'intérieur des HDL) et de la lysolécithine (éliminée des HDL). Afin de compléter l'étude des propriétés biologiques des constructions dendrimériques, le potentiel d'activation de la LCAT de ces constructions a été évalué.

### **5.1. Reconstitution de complexes DPPC/trimère apoA-I [145-183]/cholestérol**

Pour mesurer l'activité LCAT, des HDL ont été reconstituées avec du DPPC et du cholestérol, d'une part, et la construction trimérique apoA-I [145-183], d'autre part, par la technique au cholate. L'incubation du mélange a été réalisée à 43°C, en présence de cholate de sodium, pendant 16 heures, selon le rapport initial phospholipides/cholestérol/peptide 3/3/1 (en masse). Après élimination du détergent sur bille de polystyrène divinylbenzène (Bio-Beads SM-2, Bio-Rad), les complexes générés ont été isolés par gel-filtration sur colonne Superpose 6PG

(Pharmacia, Suède). Les fractions du profil de séparation présenté sur la **figure 63**, ont été caractérisées du point de vue de leur contenu en peptide par la fluorescence de la tyrosine ( $\lambda$  absorption : 280 nm,  $\lambda$  émission : 305 nm), du point de vue de leur teneur en phospholipides par un kit de dosage enzymatique spécifique (Biomerieux, France) et du point de vue de la teneur en cholestérol par un autre kit de dosage enzymatique (Boehringer, Allemagne). Ce profil montre clairement l'isolement d'un pic correspondant à un complexe composé du peptide, de phospholipides et de cholestérol.



**Figure 64.** Profils de séparation des complexes DPPC/trimère apoA-I[145-183]/cholestérol sur colonne Superpose 6PG.

**Tableau 13.** Caractéristiques physico-chimiques des HDL reconstituées DPPC/cholestérol/trimère apoA-I [145-183] ou DPPC/cholestérol/apoA-I.

Peptide	Rapport molaire DPPC/chol./pep.	Nombre de peptide par complexe	% molaire en cholestérol	Rayon de stokes (nm)
Trimère apoA-I [145-183]	106/3,5/1	3	3,25	6,4
ApoA-I native	91/8/1	2	8	5,3



Ces particules purifiées ont ensuite été caractérisées du point de vue de leur composition chimique et de leur taille. Ces caractéristiques physico-chimiques sont répertoriées dans le **tableau 13**. Les complexes générés avec le trimère apoA-I [145-183] sont légèrement différents de ceux générés avec l'apoA-I entière. En particulier, la proportion de cholestérol incorporé est 2 fois plus importante dans les DPPC/chol/apoA-I que dans les complexes contenant la construction trimérique.

### 5.2. Activation de la LCAT par des complexes DPPC/cholestérol/trimère apoA-I [145-183]

Le protocole expérimental utilisé pour déterminer la capacité d'activation du trimère apoA-I [145-183] est décrit en détail sur la fiche technique N°7. Brièvement, un réacteur contenant les particules DPPC/cholestérol/trimère apoA-I[145-183], la LCAT, du  $\beta$ -mercaptoéthanol (activateur de l'enzyme) et de la BSA (pour piéger les lysolécithines) est incubé à 37°C. Des prélèvements sont effectués et, après extraction, le cholestérol estérifié est quantifié par RP-HPLC dans chacun des échantillons. Un standard interne est utilisé pour s'affranchir de la qualité de l'extraction.

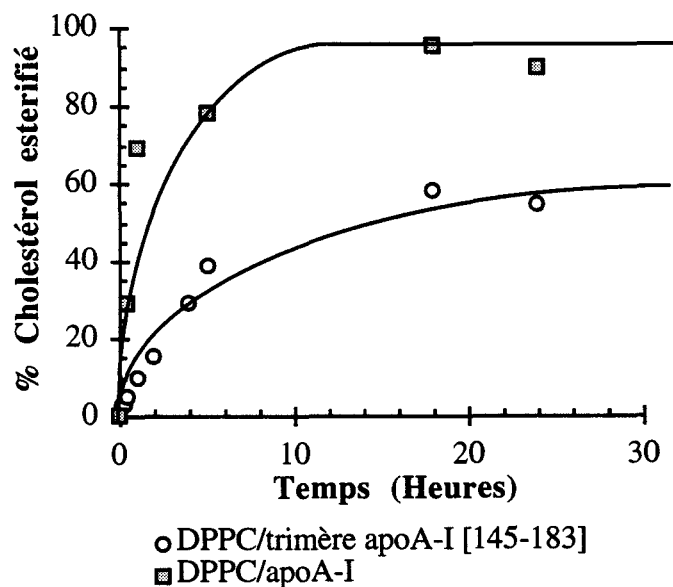


Figure 65. Activation de la LCAT par des complexes générés avec du DPPC, du cholestérol et le trimère apoA-I [145-183] ou l'apoA-I native.

spécificité des anticorps A44 et A73 pour la région 149-186 de l'apoA-I et la spécificité de l'anticorps A11 pour les régions 99-105 et 126-132 de l'apoA-I. Cette étude a également permis de valider au niveau structural le modèle d'HDL synthétique proposé dans cette thèse. En effet, les anticorps monoclonaux reconnaissent les peptides dendrimériques au sein des HDL reconstituées. Ceci suggère que le motif hélice-coude-hélice 145-183 s'organise au sein des constructions dendrimériques suivant une conformation proche de celle adoptée par cette même séquence dans l'apoA-I native. Ces résultats confirment ainsi les capacités mimétiques importantes de ces constructions synthétiques.

L'apolipoprotéine A-I, principal composant protéique des HDL, est à l'origine de nombreuses fonctions biologiques de ces lipoprotéines plasmatiques. En particulier, l'apoA-I active la lécithine cholestérol acyltransférase<sup>11,43</sup> (LCAT), enzyme qui catalyse l'estérification du cholestérol au sein des HDL. D'autre part, l'apoA-I est capable de se fixer spécifiquement sur les cellules d'origine hépatique<sup>106,201</sup> ou extra-hépatique<sup>20,209</sup> (périphériques). Enfin, elle interviendrait dans l'induction de l'efflux de cholestérol des cellules périphériques. Afin de compléter l'étude des peptides dendrimériques, le potentiel biologique des HDL reconstituées avec les constructions trimériques et tétramériques apoA-I [145-183] et apoA-I [102-140] a été évalué.

L'étude de la fixation directe a permis de montrer que les complexes générés par les dendrimères apoA-I [145-183] sont capables de se fixer de façon spécifique sur les cellules HeLa. De plus, ces particules entrent en compétition avec les complexes DMPC/apoA-I radiomarqués pour la fixation sur ces cellules. En revanche, la fixation sur cellule HeLa des particules générées avec le tétramère apoA-I [102-140] est moins importante et aucune compétition n'est observée entre ces complexes et les complexes DMPC/apoA-I marqués. Bien que les caractéristiques physico-chimiques des particules discoïdales générées avec les constructions intégrant les deux séquences présentent des différences sensibles, ces résultats confirment l'importance de la région 145-183 de l'apoA-I pour la fixation sur les cellules. Deux hypothèses sont généralement avancées pour expliquer le mécanisme de l'interaction des HDL avec les cellules périphériques. Ces hypothèses mettent en jeu l'apolipoprotéine A-I, soit dans une liaison de type apolipoprotéine-protéine membranaire<sup>20</sup> (récepteur HDL putatif), soit dans une interaction de type apolipoprotéine-lipides<sup>21</sup> (interaction avec les lipides membranaires). Pour l'une ou l'autre de ces hypothèses, la taille des complexes et leur composition chimique n'apparaît pas décisive. En revanche, l'accessibilité des segments protéiques impliqués ainsi que leur conformation sont probablement très importantes dans les deux types de fixation avancés. L'immunoréactivité des particules générées avec les constructions peptidiques suggère que la conformation des séquences au sein des peptides est proche de celle des segments natifs. Par ailleurs, le tétramère apoA-I [102-140] possède un nombre de peptides par complexe plus élevé que les 2 constructions dendrimériques générées avec la séquence 145-183. L'absence de

fixation observée avec les particules présentant la séquence 102-140 n'est donc sans doute pas la conséquence d'une faible accessibilité du motif structural. Même si des études complémentaires semblent nécessaires, ces résultats suggèrent fortement que la séquence 102-140 de l'apolipoprotéine A-I n'est pas impliquée dans la reconnaissance cellulaire de cette apolipoprotéine. Globalement, cette étude permet d'affirmer que la séquence 145-183 de l'apoA-I est suffisante pour induire la fixation de cette apolipoprotéine sur les cellules et elle conforte donc l'hypothèse du rôle biologique important de ce domaine au niveau cellulaire.

Après avoir exploré la fixation cellulaire, la capacité des constructions dendrimériques à induire un efflux de cholestérol a été comparée à celle de l'apoA-I entière. Pour cela, deux types cellulaires ont été utilisés. Le modèle adipocytaire, bien qu'ayant une origine véritablement périphérique, n'a pas donné de résultats satisfaisants. L'induction d'un efflux élevé par un sérum ne contenant pas de lipoprotéines (LPDS), donne un bruit de fond trop important pour permettre une juste comparaison des propriétés des HDL reconstituées. Ce problème a pu être évité en utilisant le modèle cellulaire d'hépatomes FU5AH, pour lequel l'efflux engendré par le témoin LPDS est négligeable. Les résultats obtenus avec cette lignée montrent que les particules générées avec les constructions dendrimériques apoA-I [145-183] induisent un efflux de cholestérol quantitativement comparable à celui obtenu avec l'apoA-I native. Quelles que soient les références choisies (taux de phospholipides, de peptides, de complexes), les efflux engendrés au bout de 4 heures d'incubation par les HDL reconstituées avec l'apoA-I native, le trimère apoA-I [145-183] ou le tétramère apoA-I [145-183] sont équivalents. Toutefois, ils existent des différences évidentes du point de vue de la cinétique d'efflux entre l'apoA-I native et les constructions dendrimériques. La comparaison des efflux à 2 heures et à 4 heures suggère que la vitesse de l'efflux induit par l'apoA-I native est constante. En effet, environ la moitié de l'efflux induit après 4 heures par l'apoA-I est réalisé au bout de 2 heures. En revanche, la vitesse initiale d'efflux par particules intégrant les dendrimères apoA-I [145-183] apparaît plus élevée que celle induite par les particules contenant l'apoA-I native. Une proportion comprise entre 65 et 79% d'efflux total à 4 heures est déjà obtenu au bout de 2 heures avec les particules synthétiques.

Le tétramère apoA-I [102-140] induit un efflux quantitativement moins important que toutes les autres particules testées, et ce, quelle que soit la référence choisie. Cependant, il a été montré dans le chapitre IV que les caractéristiques physico-chimiques des particules discoïdales générées avec les deux séquences de l'apoA-I présentent des différences sensibles. En particulier, les particules DMPC ou DPPC/tétramère apoA-I [102-140] possèdent un rayon de Stokes significativement plus important que celles générées avec la construction équivalente intégrant la séquence 145-183 de l'apoA-I. Or, l'influence de la taille des particules sur l'efflux de cholestérol est soumise à controverse. De nombreux auteurs considèrent que la taille des particules constitue un paramètre important pour l'efflux de cholestérol, dans la mesure où les

particules de petite taille sont sans doute capables de s'infiltrer plus librement dans l'espace interstitiel, site de prédilection pour l'efflux du cholestérol des cellules périphériques<sup>276</sup>. Par ailleurs, Agnelli et Marcel<sup>277</sup> ont montré que l'efflux du cholestérol de fibroblastes vers des HDL discoïdales natives peut être corrélé avec la taille des particules. En revanche, Davidson et coll.<sup>278</sup> ne détectent pas de différences significatives entre des particules reconstituées avec l'apoA-I de différentes tailles. Dans ces conditions, il apparaît difficile d'estimer de façon précise l'influence de la taille des particules DMPC/tétramère apoA-I [102-140] sur le faible efflux mesuré dans notre étude. Néanmoins, la comparaison de l'efflux des particules intégrant les deux séquences dendrimérisées est largement en faveur de la séquence 145-183 : 3,3 fois plus d'efflux que la séquence 102-140 après 4 heures d'incubation pour un taux de phospholipides constant. Ces résultats semblent en faveur de l'hypothèse d'un rôle particulier de la séquence 145-183 au niveau de l'efflux de cholestérol<sup>18,19</sup>. Toutefois, des études complémentaires mettant en jeu d'autres séquences de l'apoA-I et d'autres séquences témoins sont nécessaires afin de préciser l'origine de cette spécificité fonctionnelle.

La localisation d'un domaine responsable de l'activation de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) a fait l'objet de nombreuses études. La plupart des peptides synthétiques et des fragments de coupure chimique (CNBr) de l'apoA-I de même que d'autres apolipoprotéines échangeables, sont capables d'activer la LCAT. Ceci signifierait qu'aucun domaine particulier de l'apoA-I n'est mis en jeu lors de cette activation. Cependant, ces différentes séquences ne sont capables de mettre en oeuvre qu'au maximum 25 à 30 % de l'activation de la LCAT réalisée par l'apoA-I native. Des études utilisant des peptides synthétiques, des mutants et des anticorps désignent successivement les domaines 145-183 et 95-121 comme importants pour l'activation de la LCAT par l'apoA-I (voir chap. II.3.1.3). Nos résultats montrent qu'il n'est pas possible d'activer la LCAT de façon importante avec des complexes DPPC/cholestérol/trimère A-I [145-183] purifiés (particules produites avec la construction qui mime le mieux l'apoA-I native). L'activation de l'enzyme par cette construction constitue 16 % de l'activation relevée avec l'apoA-I, ce qui est proche de l'activation induite par l'apo E (18%) mais bien inférieure à celle induite par l'apoA-IV (38%). Fielding et Fielding<sup>76</sup> (voir chap. II.3.1.3) ont émis l'hypothèse d'une interaction électrostatique entre la LCAT et l'hélice 145-161 de l'apoA-I. Cette interaction faciliterait, selon ces auteurs, l'association de l'enzyme avec son substrat à l'interface de l'HDL. Si une telle interaction existe dans l'apoA-I, elle devrait pouvoir s'exercer au sein des constructions synthétiques dont la structure des hélices est proche de celles de l'apoA-I native dans les HDL. Toutefois, il est possible que l'arborescence de lysines constitue un obstacle au bon fonctionnement de l'enzyme en rendant l'interface lipidique peu accessible au site actif. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux par des expériences permettant de quantifier la fixation de la LCAT sur les particules générées avec l'apoA-I ou les constructions dendrimériques.

## 7. CONCLUSION

Les dendrimères peptidiques, construits à partir de la séquence 145-183, sont capables de reproduire certaines fonctions biologiques de l'apoA-I native. Il convient d'être prudent dans l'interprétation des résultats car l'application de ces modèles peptidiques dans le domaine des apolipoprotéines est inédite. Néanmoins, les éléments dont nous disposons vont dans le sens d'une implication du domaine 145-183 de l'apoA-I dans la fixation des HDL sur les cellules périphériques. En revanche, la spécificité de l'induction de l'efflux de cholestérol cellulaire par cette même région de l'apoA-I n'est pas démontrée. Cependant, nos observations montrent que les HDL reconstituées avec les dendrimères apoA-I [145-183] sont capables d'induire un efflux de cholestérol quantitativement comparable à celui obtenu avec des particules composées d'apoA-I native. Enfin, du point de vue de l'activation de la LCAT, soit les constructions dendrimériques intégrant une partie de l'apoA-I ne sont pas capables de mimer cette propriété biologique de l'apolipoprotéine, soit la séquence retenue de l'apoA-I n'intervient pas directement dans cette activation. Afin de compléter cette étude, il serait très intéressant de déterminer le potentiel de ce modèle synthétique d'apolipoprotéine au niveau d'autres propriétés biologiques de l'apolipoprotéine A-I, telles que l'activation de la mobilité spermatozoïque en association avec l'albumine et des immunoglobulines ou encore l'inhibition de la fusion membranaire de virus (chap. II.3.4).

## 8. COMMUNICATION

Ce travail n'a, pour le moment, pas fait l'objet d'une publication sous la forme d'un article. En revanche, une partie de ces résultats a fait l'objet d'une communication orale au 66<sup>ème</sup> congrès scientifique de l'*American Heart Association*, en Novembre 93.

Luchoomun J., Demoor L., Tartar A., Rosseneu M., Denèfle P., Castro G., and Fruchart J.C., (1993). A synthetic peptide that mimics properties of apoA-I. *Circulation*, suppl.88, 4/2, Abstr. 2482.

## CHAPITRE VI. APPROCHE COMBINATOIRE - RESULTATS PRELIMINAIRES

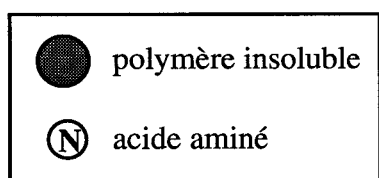
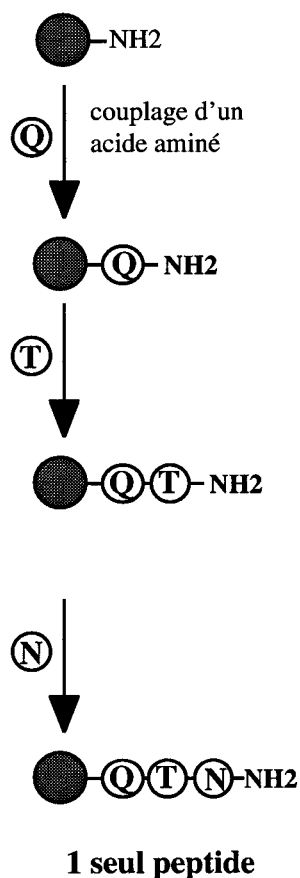
### 1. INTRODUCTION

Les résultats présentés dans le chapitre V suggèrent que la séquence 145-183 de l'apoA-I joue un rôle particulier au niveau du métabolisme de cette apolipoprotéine au sein des HDL, et qu'en particulier, elle intervient au niveau de la fixation spécifique des HDL sur la membrane des cellules HeLa. Nos travaux montrent également que ce fragment s'organise en un motif hélice-coude-hélice. Certains groupes de recherche<sup>21,22</sup> ont émis l'hypothèse que cette interaction avec les membranes cellulaires n'impliquerait pas un segment particulier de l'apolipoprotéine A-I, mais ferait appel à un mécanisme beaucoup moins spécifique, indépendant de la séquence et uniquement tributaire des propriétés physico-chimiques des différents segments hélicoïdaux. Ces auteurs proposent que n'importe quelle unité de répétition hélicoïdales de l'apolipoprotéine A-I, ainsi que celles d'autres apolipoprotéines comme l'apoA-IV, pourraient être responsables de cette interaction. Bien que nos résultats suggèrent que l'unité de répétition 102-140 de l'apoA-I n'est pas un domaine candidat à une telle interaction sur cellule HeLa, nous avons cherché à mettre au point une approche différente pour tenter d'infirmer ou confirmer l'hypothèse de l'implication d'une séquence spécifique de l'apoA-I dans la fixation des HDL sur la membrane des cellules périphériques. Notre hypothèse de travail a été la suivante : il est clairement établi que le motif structural hélice-coude-hélice, dans lequel chaque hélice présente une amphipathicité marquée, est essentiel dans l'association de l'apoA-I humaine aux phospholipides pour former des HDL<sup>135</sup>. De tels motifs sont également retrouvés dans les apolipoprotéines A-I d'autres espèces animales. Il est probable qu'au cours de l'évolution la séquence de chacun de ces motifs structuraux de l'apoA-I ait muté de manière à maintenir à la fois, la structure, et l'amphipathicité du motif. Une construction peptidique prenant en compte la dégénérescence naturelle d'un tel motif au cours de l'évolution ne devrait plus pouvoir interagir spécifiquement par l'intermédiaire d'une protéine membranaire reconnaissant des acides aminés répartis précisément dans la séquence de l'apoA-I humaine. Une telle construction constituerait alors un outil précieux pour aider à valider ou invalider l'hypothèse de la reconnaissance spécifique d'une séquence de l'apoA-I lors de la liaison des HDL à la membrane de cellules périphériques. Afin de mettre en oeuvre une telle étude, nous avons fait appel à une variante de la synthèse peptidique en phase solide : la synthèse combinatoire.

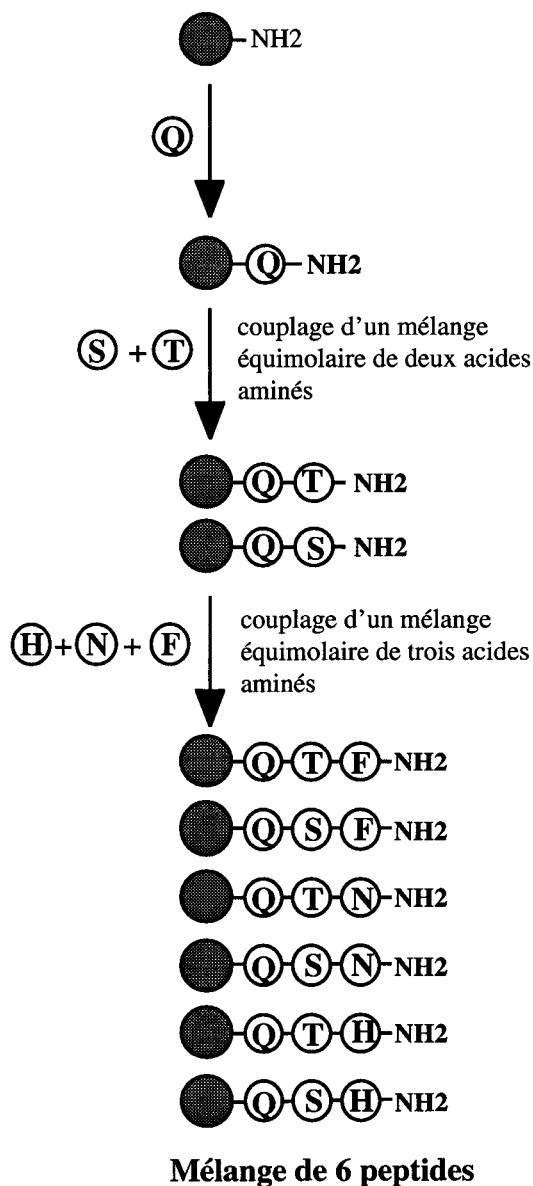
La synthèse peptidique classique met en jeu l'addition récurrente d'un acide aminé défini à la fois dans le but de donner naissance à un peptide unique (**Figure 67a**). Il y a quelques années est apparue une nouvelle technique qui permet de synthétiser, non pas un seul peptide, mais une famille de peptides. Utilisées au laboratoire dans le cadre de peptides immuno-réactifs, les constructions issues de cette approche combinatoire ont été nommées « mixotopes » ou

« bibliothèques peptidiques convergentes ». Cette technique de synthèse met en jeu, à chaque cycle, le couplage d'un ou plusieurs acides aminés sur la résine (**Figure 67b**). Le nombre de molécules peptidiques différentes obtenues dépendra du nombre de positions dégénérées et du nombre d'acides aminés différents utilisés à chacune de ces positions.

**a : Approche Classique**



**b : Approche Combinatoire**



**Figure 67. Synthèse peptidique en phase solide : approche classique et approche combinatoire.**

## 2. CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'UNE CONSTRUCTION PEPTIDIQUE DÉGÉNÉRÉE

### 2.1. Conception de la construction Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183)

Les séquences des apolipoprotéines A-I de 10 espèces animales (Chien, Rat, Souris, Homme, Macaque, Boeuf, Lapin, Poule, Cochon, Saumon) sont disponibles dans la banque de données *Swissprot*. L'alignement de ces séquences fait apparaître des pourcentages d'homologie importants entre les apoA-I des différentes espèces de mammifères (**figure 68**), suggérant ainsi une conservation importante de cette apolipoprotéine au cours de l'évolution.

	Ω	M	B	Ch	Co	L	S	R	P	Sa
apoA-I Homme (Ω)	-									
apoA-I Macaque (M)	95	-								
apoA-I Boeuf (B)	76	75	-							
apoA-I Chien (Ch)	83	81	83	-						
apoA-I Cochon (Co)	68	66	77	73	-					
apoA-I Lapin (L)	78	76	75	80	63	-				
apoA-I Souris (S)	57	55	59	62	60	58	-			
apoA-I Rat (R)	83	58	61	63	52	61	62	-		
apoA-I Poulet (P)	60	49	46	49	43	48	38	41	-	
apoA-I Saumon (Sa)	21	21	20	19	18	20	20	19	23	-

**Figure 68. Pourcentages d'homologie existant entre les apoA-I de différentes espèces.**

Les données découlent d'alignements de séquences réalisés à l'aide du logiciel DNA-★.

En prenant l'apoA-I humaine pour référence, les pourcentages d'homologie dépassent 57% pour toutes les espèces, exception faite du saumon qui semble nettement plus divergent (21% d'homologie seulement). Les faibles divergences inter-espèces, mesurées avec la séquence globale de l'apolipoprotéine A-I, sont d'autant moins importantes que l'on se focalise sur les différentes unités de répétition de cette apolipoprotéine et en particulier sur la région qui correspond, après alignement, à la séquence 145-183 de l'apoA-I humaine (**Figure 69**).

	Ω	M	B	Ch	Co	L	S	R	P	Sa
apoA-I Homme (Ω)	-									
apoA-I Macaque (M)	97	-								
apoA-I Boeuf (B)	77	77	-							
apoA-I Chien (Ch)	82	82	77	-						
apoA-I Cochon (Co)	77	77	79	72	-					
apoA-I Lapin (L)	74	75	69	69	61	-				
apoA-I Souris (S)	59	59	54	64	49	56	-			
apoA-I Rat (R)	46	46	39	51	41	44	59	-		
apoA-I Poulet (P)	61	61	61	54	59	59	51	49	-	
apoA-I Saumon (Sa)	36	33	33	28	25	31	35	31	39	-

**Figure 69. Pourcentages d'homologie obtenus après l'alignement des séquences de différentes espèces avec le motif 145-183 de l'apoA-I humaine.**

Les données découlent d'alignements de séquences réalisés à l'aide du logiciel DNA-★.



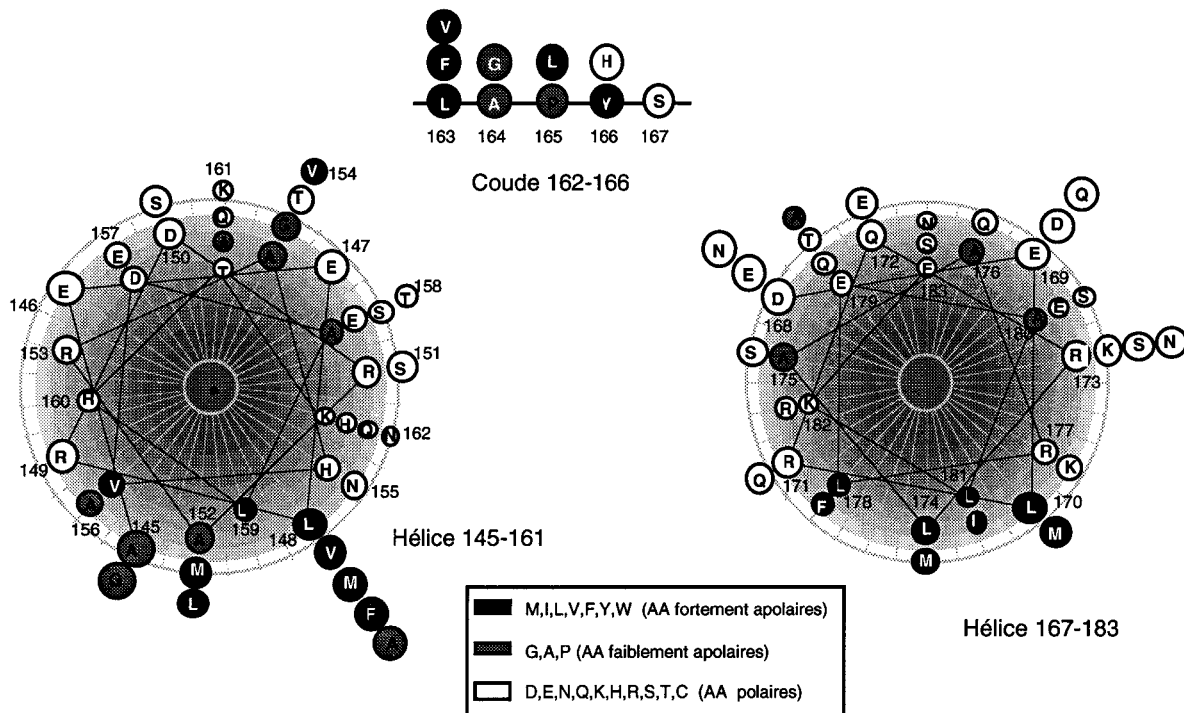
On peut cependant remarquer que cette région de l'apoA-I est très divergente chez le saumon comparativement aux autres espèces. Nous avons donc envisagé de dégénérer la séquence 145-183 humaine sur la base de la diversité observée après alignement des séquences d'apoA-I de différentes espèces (Chien, Rat, Souris, Homme, Macaque, Babouin, Poule, Cochon, Boeuf) en excluant le saumon (**Figure 70**).

	145	183
Homme	GEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDEL RQRLAARLEALKE	
Souris	A • F • • M • T • • S • • Q • • H • EQM • ES • • Q • • AE • • S	
Rat	A • F • • M • VNA • • • AKFGL • • • QM • EN • • Q • • TEI RN	
Lapin	A • L • • S • • T • • T • • K • • • • N • • Q • • • • • SI • •	
Macaque	• • • V •	
Poule	A • • A • • L • G • • EE • • KN • • • • • • • • • • • K • SQ • • EI R •	
Boeuf	• • • V •	
Chien	• • • L • • • • T • • • • • AQ • • • • • D • • E • • • • • Q • • • •	
Cochon	A • L • • L • • • • E • • • Q • V • • • • • D • • • • M • • • F • • • • •	
Saumon	V • • • • AKVAVN • EETK • K • M • I VEI V • AK • TE • • • E • RT	

**Figure 70. Dégénérescence naturelle du fragment 145-183 de l'apoA-I humaine au cours de l'évolution.**

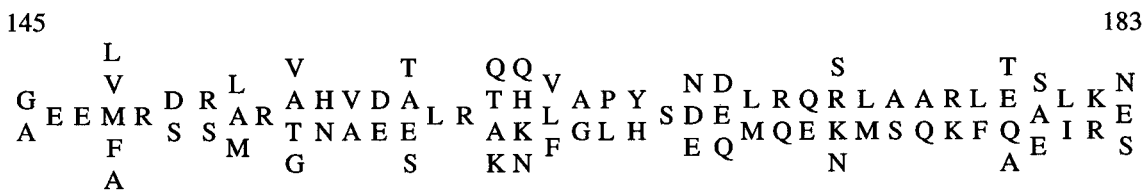
La numérotation est basée sur l'apoA-I humaine et l'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel DNA-★. Pour simplifier, un point (•) indique les positions homologues à la séquence humaine.

Afin d'estimer, les conséquences de ces mutations au niveau de la structure secondaire et surtout au niveau de l'amphipathicité des peptides, nous avons utilisé la représentation de Schiffer-Edmunson<sup>119</sup> pour chacune des deux hélices considérées en y faisant figurer les dégénérescences prévues (**figure 71**). Cette représentation permet de visualiser que la divergence existante au niveau des faces hydrophobes des hélices amphipathiques (résidus 145, 148, 152, 156 pour l'hélice 165-161 et 170, 174, 178, 181 pour l'hélice 167-183) n'entraîne pas, ou peu, de variation de la polarité. Par exemple, le résidu 148 de l'apoA-I humaine est une méthionine et les acides aminés divergents pour les autres espèces sont F, A, V et L, c'est à dire des acides aminés également apolaires. En conséquence, la dégénérescence appliquée au niveau des résidus appartenant aux faces hydrophobes des hélices devrait peu affecter leur amphipathicité.



**Figure 71. Représentation de Schiffer-Edmunson des fragments 145-161 et 167-183 de l'apoA-I humaine, dégénérées au niveau des positions divergentes observées dans les espèces suivantes : Chien, Boeuf, Cochon, Macaque, Poule, Lapin, Rat, et Souris. La dégénérescence du segment 162-166 est également indiquée.**

A la suite de cette étude préliminaire, une famille de peptides, partiellement représentatif de la dégénérescence naturelle inter-espèces du segment 145-183 de l'apoA-I (**figure 72**), a donc été synthétisée. Cette construction appelée Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) présente un nombre total de combinaisons d'acides aminés représentant 7800 milliards de peptides différents. Compte tenu des résultats présentés dans le chapitre IV concernant les peptides dendrimériques, ces peptides ont été synthétisés sur une matrice trimérique dans le but d'augmenter leur réactivité vis-à-vis des phospholipides lors de la reconstitution d'HDL discoïdales.



**Figure 72. Composition de la construction Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) représentant partiellement la dégénérescence naturelle inter-espèce du segment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I humaine.**

## 2.2. Synthèse de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183)

La synthèse du peptide Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) a été menée à l'aide d'un synthétiseur automatique 430A ABI sur 0,5 mmole de résine trimérique. La stratégie Boc/benzyl a été retenue en utilisant la DCC et l'HOBt comme agents d'acylation. Le rendement de couplage des acides aminés a été optimisé au moyen d'un double couplage systématique.

La présence de plusieurs acides aminés en mélange aux positions dégénérées pose un premier problème important au niveau de la synthèse : leur mise en solution. En effet, chaque acide aminé possède une capacité et une cinétique de solvation spécifiques et, par ailleurs, la présence d'un acide aminé dans un mélange peut avoir une influence sur la mise en solution d'un autre acide aminé du mélange. Pour éviter ces problèmes, nous avons choisi de mettre en solution extemporanément et manuellement chaque mélange d'acides aminés dans le NMP/DCM (70/30 en volume). Après s'être assuré de la totale dissolution des acides aminés, la solution a été directement disposée dans l'automate sous forme liquide, au moyen d'une cartouche propre.

Par ailleurs, deux conditions différentes de couplage ont été utilisées :

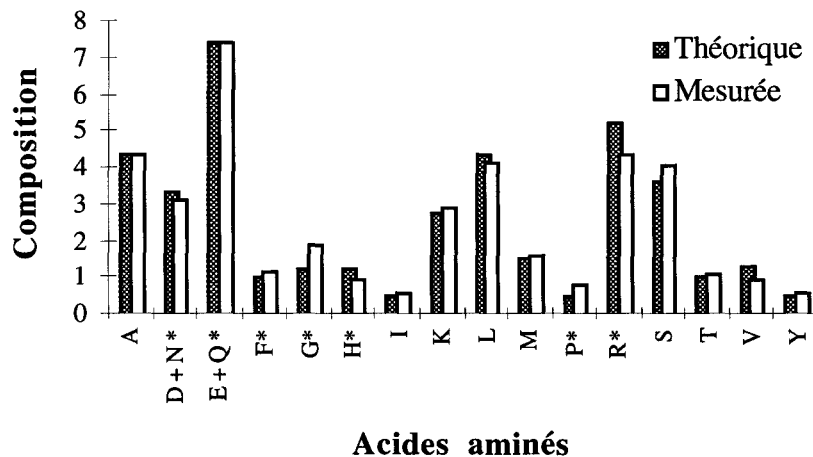
Pour chaque position non dégénérée (un seul acide aminé), le programme classique de synthèse a été appliqué pour les deux couplages successifs de 1 mmole d'acide aminé.

Pour chaque position dégénérée (mélange d'acides aminés), un autre problème s'est présenté car certains acides aminés possèdent des cinétiques de couplage plus rapides que d'autres. En conséquence, si on plaçait la résine en présence d'un large excès du mélange, la compétition pour les fonctions amines réactives du peptide en cours d'élongation serait favorable aux acides aminés présentant des cinétiques de couplage rapides, empêchant ainsi le couplage équitable de chaque acide aminé du mélange. Pour éviter ce problème le premier couplage a été réalisé au moyen d'un mélange équimolaire et stoechiométrique d'acides aminés (par rapport aux fonctions NH<sub>2</sub> de la résine). 0,5 mmole du mélange d'acides aminés a donc été appliquée sur la résine pendant une durée correspondant au temps de couplage de l'acide aminé possédant la cinétique de couplage la moins rapide. Cette stratégie a permis d'éviter toute incorporation privilégiée d'un acide aminé par rapport à un autre. A l'issue du premier couplage, on considère généralement que les fonctions amines ont réagi avec un rendement proche de 100%. Dès lors, nous avons effectué le second couplage avec un excès du mélange d'acides aminés, sans craindre de bouleverser de façon importante la proportion des acides aminés incorporés.

Comme pour tous les peptides synthétisés précédemment, les extrémités N-terminales de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) ont été acétylées. En fin de synthèse, la protection de la chaîne latérale de l'His (DNP) a été clivée par thiolysse et une coupure à l'acide fluorhydrique a permis le clivage du support insoluble et la déprotection des autres chaînes latérales. Le peptide a été isolé par précipitation dans l'éther froid après solubilisation dans le TFA pur. Enfin, dans le but d'éliminer les sous-produits de synthèse de petite taille et les *scavengers* résiduels, le brut de coupure HF a été dialysé contre de l'eau ultra-pure au moyen d'une cellule d'ultra-filtration munie d'une membrane cellulosique (seuil : 5000 Da).

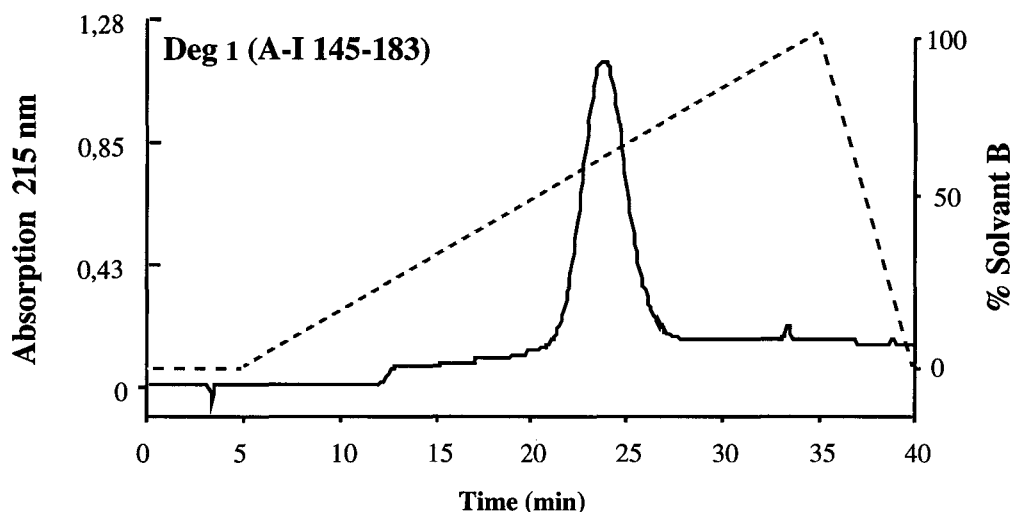
### 2.3. Caractérisation de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183)

L'identité du mélange de peptides a été déterminée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale. Cette analyse est comparée sur la **figure 73** à la composition théorique de l'ensemble des peptides de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183). Les différences entre valeurs théoriques et mesurées sont remarquablement faibles et nous permettent de conclure au bon déroulement de la synthèse de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183).



**Figure 73. Compositions en acides aminés théorique et mesurée de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183).**

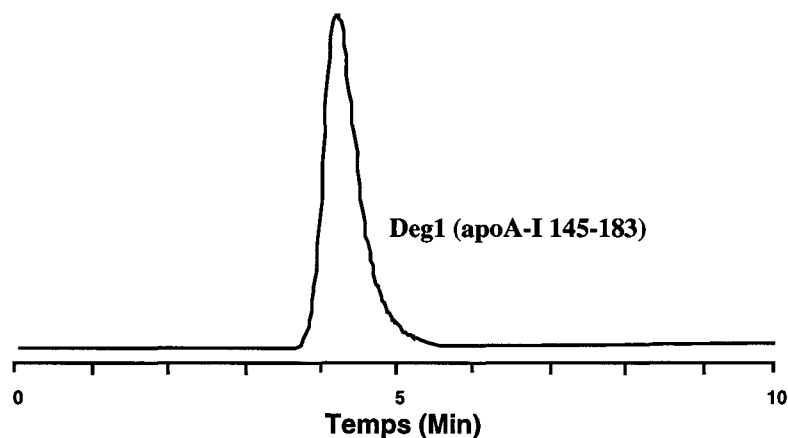
L'analyse a été réalisée à l'aide d'un système chromatographique d'échange de cations haute performance *Beckman Analyser 6300* (Fullerton, USA) après hydrolyse acide des peptides par l'HCl 6N, en présence de phénol 5% (en volume), pendant 24 heures, à 110°C. La composition est exprimée en nombre de résidus.



**Figure 74. Profil RP-HPLC de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183).**

Colonne (1 x 200 mm) avec silice greffée C<sub>4</sub>, 9 nm de porosité pour 10 µm de diamètre (Vydac Hesperia, CA, USA), gradient linéaire de 0 à 100% de solvant B en 30 min, débit 1 ml/min, système éluant : solvant A. TFA 0,05% dans H<sub>2</sub>O (en volume); solvant B. TFA 0,05%, CH<sub>3</sub>CN 60% dans H<sub>2</sub>O (en volume).

L'homogénéité de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) a été contrôlée par RP-HPLC analytique sur colonne C<sub>4</sub>. Le profil présenté sur la **figure 74** met en évidence la remarquable homogénéité de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) sous la forme d'un pic unique et symétrique, confirmant ainsi le bon déroulement de la synthèse de ce peptide. L'homogénéité de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) est a été confirmée par l'analyse en électrophorèse capillaire (**figure 75**) qui révèle également un pic unique et symétrique.



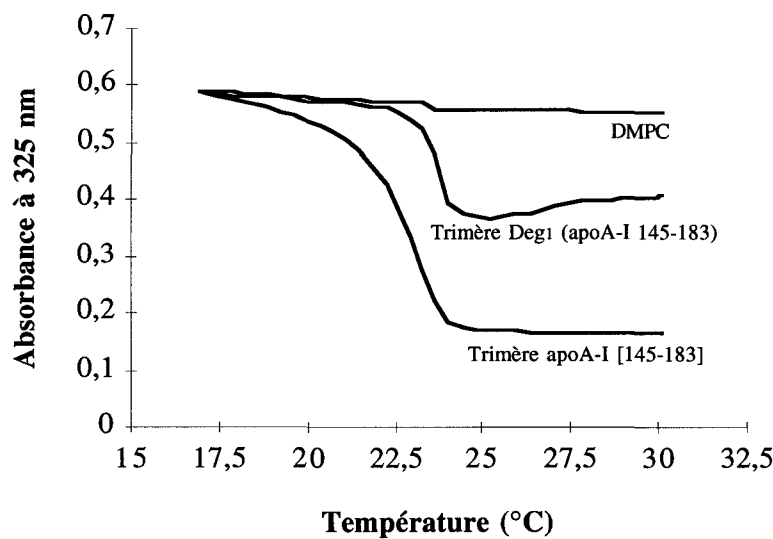
**Figure 75. Profil électrophorétique de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) dialysé obtenu en électrophorèse capillaire.**

Electrophorèse capillaire Applied Biosystems model 270 A (Foster city, CA), 25 kV de tension appliquée, capillaire en silice de 50 cm de longueur et de 50 µm de diamètre. La séparation a été effectuée à 30°C, dans un tampon citrate de sodium 20 mM, à pH 2,5. La détection a été réalisée à 200 nm.

### 3. ASSOCIATION DE Deg<sub>1</sub> (APOA-I 145-183) AUX PHOSHOLIPIDES

#### 3.1. Mesures de turbidité

La formation de petits complexes discoïdaux quand Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) est mis en présence de vésicules multilamellaires de phospholipides (DMPC) a été étudiée au moyen d'un suivi de la turbidité (absorption à 325 nm) en fonction de la température. Les résultats sont indiqués sur la **figure 76**. Ils montrent que la construction trimérique Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) interagit avec le DMPC puisque la suspension de phospholipides se clarifie en présence du peptide aux environs de la température de transition du DMPC (23°C). Cependant, la diminution de turbidité observée avec Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) est environ deux fois moins importante que celle observée, dans les mêmes conditions, avec le trimère apoA-I [145-183]. La construction Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) possède donc une capacité d'association au DMPC inférieure à celle du trimère apoA-I [145-183]. De plus, la légère remontée de l'absorption au delà de 27°C suggère que l'association au DMPC de certains peptides de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) pourrait être instable

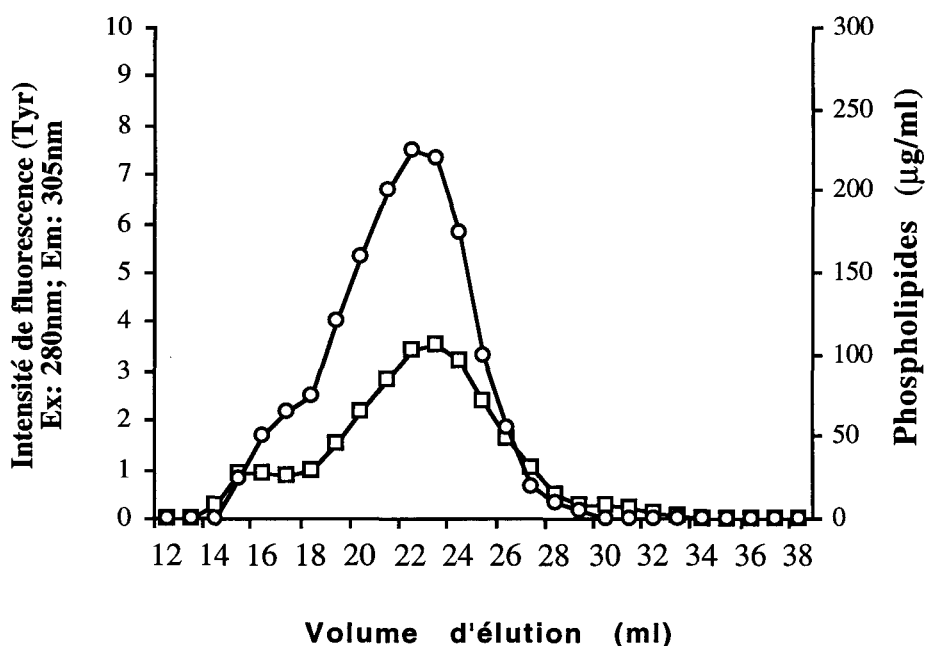


**Figure 76. Association des peptides trimériques apoA-I [145-183] et Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) au DMPC, en fonction de la température.**

L'association a été suivie par mesure de l'absorbance à 325 nm en fonction de la température. Rapport DMPC/peptide utilisé : 2/1 (en masse).

### 3.2. Essais de reconstitution de HDL

Le peptide Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183), d'une part, et le DPPC, d'autre part, ont été utilisés pour produire des HDL reconstituées. Pour cela la technique au cholate couplée à l'élimination du détergent par chromatographie d'adsorption sur bille de polystyrène divinylbenzène (Bio-Beads SM-2, Bio-Rad) ont été employées. Les complexes DPPC/peptides a été isolés par chromatographie de gel filtration sur une colonne Superose 6PG à température ambiante. Les fractions obtenues ont été caractérisées du point de vue de leur contenu en peptide par la fluorescence de la tyrosine ( $\lambda$ absorption : 280 nm,  $\lambda$  émission : 305 nm) et du point de vue de leur concentration en phospholipides par un kit de dosage enzymatique (Biomerieux).



**Figure 77. Profils de séparation des complexes DPPC/Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) par chromatographie de gel-filtration sur colonne Superose 6PG.**

La concentration en lipides en µg/ml (symboles ronds) et l'intensité de fluorescence de la tyrosine (symboles carrés) sont représentées en fonction du volume d'élution de la colonne.

Le profil de séparation des complexes DPPC/Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) est présenté sur la **figure 77**. On constate la formation de complexes DPPC/peptide caractérisés par la présence d'un large pic, élué vers 22 ml, pour lequel la présence simultanée de lipides et de peptides est mise en évidence. On retrouve peu de matériel lipidique libre en amont du profil et la totalité de la construction peptidique incubée avec les phospholipides semble avoir réagi, puisqu'aucun pic correspondant au peptide libre n'est élué après celui des complexes. Les caractéristiques

physico-chimiques des complexes isolés sont présentées dans le **tableau 14**. Elles sont comparées à celles mesurées précédemment sur les HDL reconstituées à partir de l'apoA-I native ou du trimère apoA-I [145-183]. Alors que les particules obtenues avec ces 2 molécules amphipathiques possèdent des propriétés physico-chimiques voisines, les HDL reconstituées avec le peptide Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) sont, elles, très spécifiques. En particulier, le rapport molaire phospholipides/peptide (33) au sein de ces particules est 2 fois moins important, suggérant un enrichissement des particules en peptides. Ce résultat est confirmé par la détermination du nombre de moles de peptide par complexes qui est sept fois plus important que dans les particules reconstituées avec l'apoA-I native. Ceci rend probablement compte d'une distribution atypique des molécules amphipathiques au sein des complexes reconstitués avec la construction dégénérée. En effet, la taille des particules DPPC/Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) n'est que 1,7 fois plus importante que celle des complexes DPPC/apoA-I. Ces données montrent spécificité des particules reconstituées avec le peptide Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183), comparées à celles obtenues avec l'apoA-I native ou le trimère apoA-I[145-183]. Des résultats du même ordre ont été obtenus en parallèle, en utilisant le DMPC comme phospholipide.

**Tableau 2. Composition chimique et taille des HDL reconstituées avec le DPPC et les peptides trimériques apoA-I [145-183] ou Deg<sub>1</sub> (A-I 145-183), ou l'apoA-I native.**

HDL Reconstituées DPPC/Peptide ou protéine	PL/Prot Rapport molaire(a)	mole PL/ hélice théorique	mole prot/ complexe	rayon de Stokes (nm) (b)
<b>DPPC/Trimère Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183)</b>	33	0,73	15	9,3
<b>DPPC/Trimère apoA-I [145-183]</b>	78	13	2	5,8
<b>DPPC/apoA-I native</b>	85	14	2	5,5

(a) : PL : phospholipides, Prot : trimère apoA-I [145-183], trimère Deg<sub>1</sub>(A-I 145-183) ou apoA-I native

(b) : mesuré en fonction du volume d'élution des complexes sur la colonne Superose 6PG calibrée

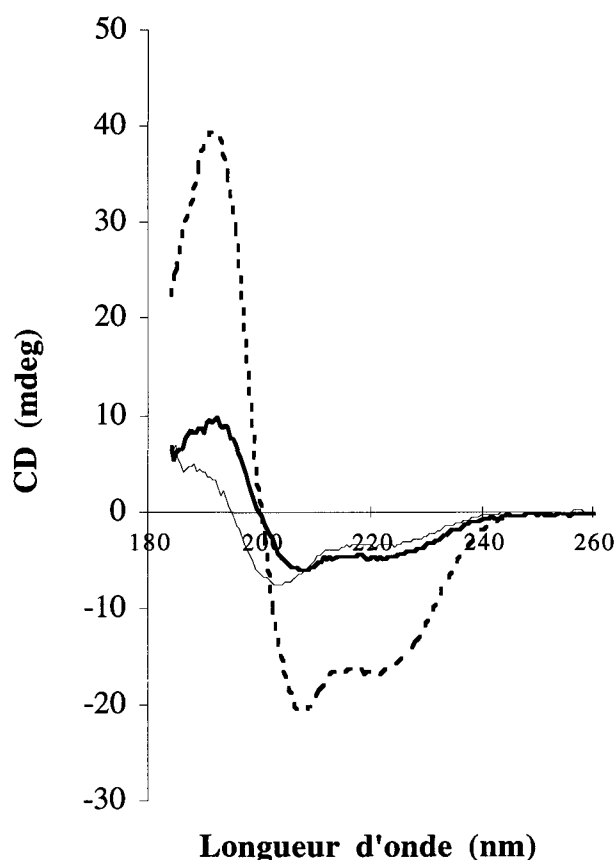
#### 4. STRUCTURE SECONDAIRE DE Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183)

Les pourcentages de structures secondaires du peptide Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) trimérique ont été déterminés par dichroïsme circulaire. Les différents spectres, obtenus à l'aide d'un



spectropolarimètre JASCO 710, sont présentés sur la **figure 77**. Trois types d'environnement ont été choisis pour l'accumulation de ces spectres :

- tampon phosphate 10 mM pH 7,4
- complexes DPPC/Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) purifiés sur Superose 6PG
- tampon phosphate 10 mM pH 7,4/ TFE (1/1 en volume)



**Figure 78. Spectres de dichroïsme circulaire de la construction trimérique Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) à pH 7,4 et à 23°C.**

Ligne pleine fine : Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) à 0,1 mg/ml dans un tampon phosphate 10 mM.

ligne pleine forte : DPPC/Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) à 0,1 mg/ml

pointillés : Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) 0,1 mg/ml dans un mélange tampon phosphate 10 mM pH 7,4/ TFE (1/1 en volume)

Les pourcentages d' $\alpha$ -hélicité de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) ont été calculés selon Chen et Yang<sup>279</sup> grâce à la mesure de l'ellipticité de l'échantillon à 222 nm ( $[\theta]_{222 \text{ nm}}$ ) calculée suivant l'équation (6) :

$$[\theta]_{222 \text{ nm}} = \frac{(\theta_{222 \text{ nm}} - \theta_{250 \text{ nm}}) \cdot \text{MRW}}{10 \cdot d \cdot [C]} \quad (6)$$

où  $\theta$  est la valeur de dichroïsme circulaire mesurée à la longueur d'onde indiquée, MRW la masse moléculaire moyenne de la construction peptidique,  $d$  le trajet optique en cm et  $[C]$  la concentration en g/l de l'échantillon. On peut déduire de l'ellipticité à 222 nm, le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité de l'échantillon à l'aide de l'expression (7) :

$$\% \alpha\text{-hélicité} = \frac{([\theta]_{222 \text{ nm}} + 3000)}{36000 + 3000} \quad (7)$$

Les valeurs d' $\alpha$ -hélicité ainsi calculées pour les constructions trimériques apoA-I [145-183] et Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) sont présentées dans le **tableau 15**.

**Tableau 15. Pourcentages d' $\alpha$ -hélicité déterminés par mesures de dichroïsme circulaire sur les constructions trimériques apoA-I [145-183] et Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) dans différents environnements.**

Les mesures ont été effectuées sur les constructions peptidiques en solution dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4, ou sur des complexes DMPC/peptide purifiés sur colonne Superose 6PG, ou dans un mélange TFE/tampon phosphate 10 mM pH 7,4 (1/1 en volume).

	$\alpha$ -hélicité (%)
<b>Trimère Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183)</b>	
Tampon	16
HDL reconstituées	21
TFE 50%	51
<b>Trimère apoA-I [145-183]</b>	
Tampon	41
HDL reconstituées	56
TFE 50%	83

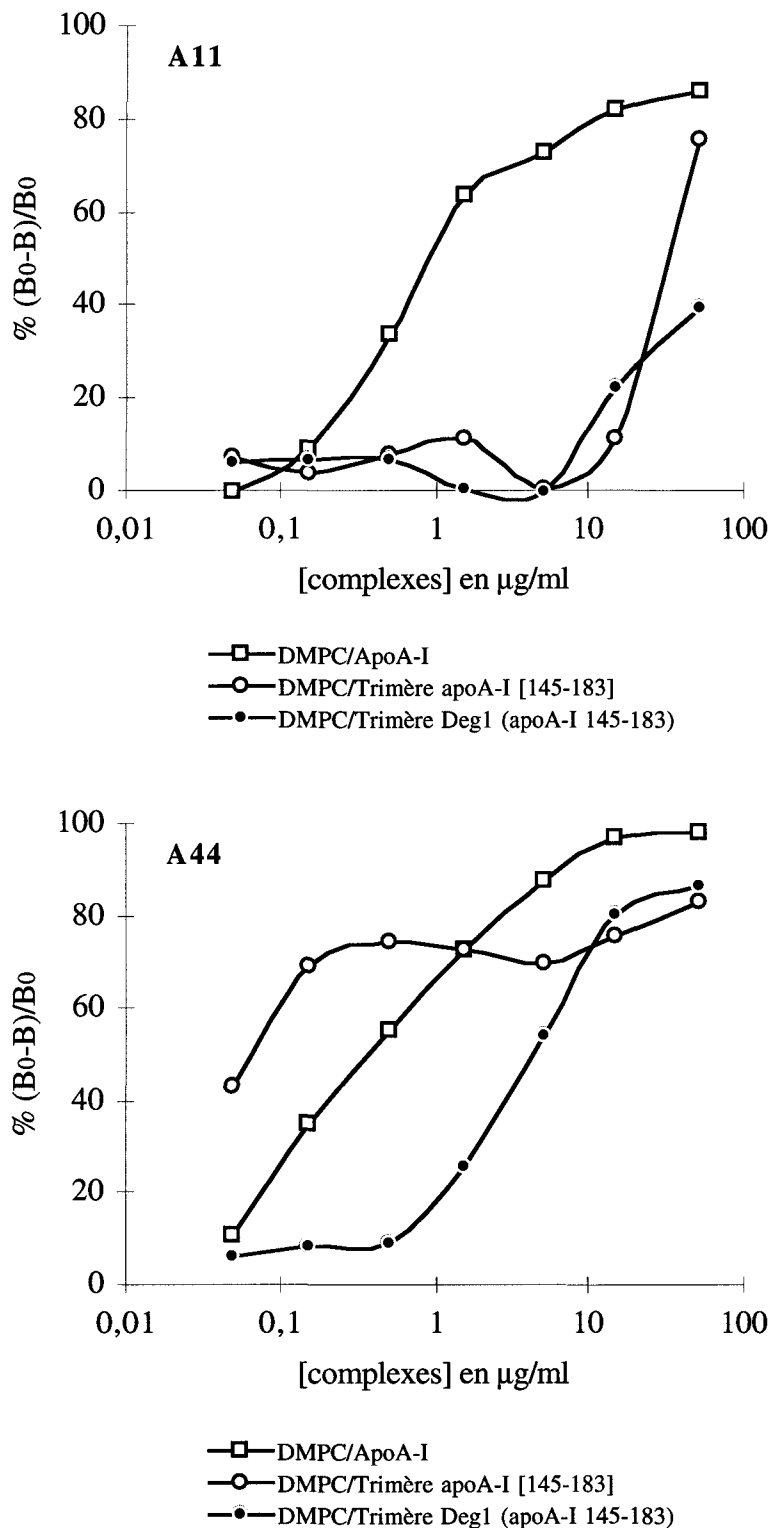
Dans les 3 environnements choisis (aqueux, lipidique, TFE), les pourcentages d' $\alpha$ -hélicité de la construction Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) sont toujours sensiblement inférieurs aux valeurs mesurées avec la construction trimérique apoA-I [145-183] dans les mêmes conditions. En solution aqueuse et en présence de lipides, on constate que le pourcentage d' $\alpha$ -hélicité de la construction peptidique dégénérée est 2,5 fois moins important que celui de la construction non dégénérée. Dans le TFE, la construction Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) atteint 51% d' $\alpha$ -hélicité contre 83% pour le trimère apoA-I [145-183]. Les valeurs mesurées pour Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) constituent des valeurs moyennes, difficilement interprétables d'un point de vue qualitatif

puisque correspondant, non pas à un peptide unique, mais à un ensemble de peptides. Toutefois, il apparaît clairement que la dégénérescence naturelle du fragment 145-183 de l'apo A-I humaine entraîne des modifications structurales importantes au niveau des unités de répétition hélice-coude-hélice d'un certain nombre de peptides constituant Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183).

### 5. IMMUNOREACTIVITE DE DEG<sub>1</sub> (APOA-I 145-183)

Dans le chapitre V (chap. V.2.1 et V.2.2), il a été montré que les HDL reconstituées avec les peptides dendrimériques apoA-I [145-183] sont reconnus par l'anticorps monoclonal A44 qui est spécifique de la région 143-189 de l'apoA-I humaine mais pas par l'anticorps monoclonal A11 qui reconnaît l'épitope discontinu 99-105/126-132 de cette même apolipoprotéine. La réactivité de ces anticorps vis-à-vis de la séquence 145-183 de l'apoA-I humaine dégénérée a également été évaluée. Dans ce but, la technique radio-immunologique (RIA) a été employée (voir chap. V.2.1) en utilisant comme antigène des HDL reconstituées avec, d'une part, du DMPC et, d'autre part, les constructions trimériques apoA-I [145-183] ou Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183). Ces résultats sont présentés sur la **figure 79**.

Les données obtenues montrent que l'anticorps monoclonal A11, pour lequel on vérifie la réactivité vis-à-vis de l'apoA-I native au sein des complexes DMPC/apoA-I, n'est pas réactif vis-à-vis des deux constructions trimériques lorsqu'elles sont liées au DMPC dans les HDL reconstituées. L'anticorps monoclonal A44 reconnaît les complexes DMPC/apoA-I et DMPC/trimère apoA-I [145-183], ce qui est attendu puisqu'il est spécifique la séquence 143-189 de l'apoA-I humaine. La faible réactivité de l'A44 vis-à-vis de la construction trimérique Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) est un résultat peu surprenant. Pour l'expliquer, il convient de rappeler que l'on est en présence d'une famille non homogène de peptides et que tous les membres de cette famille ne sont vraisemblablement reconnus par l'anticorps A44 avec la même affinité. Ceci est confirmé par la nécessité d'augmenter de façon importante la concentration en complexes (environ 10 µg/ml) pour atteindre le même signal que celui obtenu avec les complexes formés à partir de la construction trimérique apoA-I [145-183]. Même si la réactivité de l'anticorps A44 pour la construction Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) est faible, elle existe et est suffisante pour être détectée. Ceci s'explique par le fait que l'A44 est mis en contact avec une bibliothèque combinatoire de peptides suffisamment convergente. Ainsi, la famille Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) constitue un continuum de peptides aptes à réagir spécifiquement avec l'anticorps monoclonal A44, et ce avec une affinité relativement élevée.



**Figure 79.** Réactivité des anticorps A11 (spécifique des régions 99-105 et 126-132 de l'apoA-I humaine) et A44 (spécifique de la région 149-186 de l'apoA-I humaine) vis-à-vis des HDL discoïdaux reconstitués à partir de l'apo A-I native ou des constructions trimériques A-I [145-183] ou Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183).  
 % (Bo-B)/Bo correspond au pourcentage de fixation de l'anticorps considéré sur l'antigène à la concentration indiquée.

## 6. DISCUSSION

L'objectif de l'approche combinatoire abordée dans ce chapitre était de produire une famille dégénérée de peptides, présentant tous une structure et des propriétés physico-chimiques communes et proches de celles du trimère apoA-I [145-183]. Cet objectif n'a été que partiellement atteint avec la construction Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183). Les études d'association aux lipides et de dichroïsme circulaire montrent que vraisemblablement une seule partie de cette famille de peptides possède les propriétés attendues. Du point de vue de l'association aux lipides, la construction trimérique Deg<sub>1</sub> (A-I 145-183) apparaît moins performante que la construction issue de la séquence humaine non dégénérée. Du point de vue structural, les spectres de dichroïsme circulaire indiquent que le pourcentage d'hélicité moyen du trimère Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) n'atteint, dans le TFE, que 50% alors que dans ce solvant apolaire la structuration en hélice  $\alpha$  du trimère apoA-I [145-183] représente 83%. De même, les mesures réalisées avec les complexes DMPC/constructions peptidiques confirment la capacité globalement plus faible des peptides de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) à se structurer en hélice  $\alpha$ .

Toutefois, les résultats obtenus au niveau de la reconstitution d'HDL avec la construction dégénérée mettent en évidence le potentiel important de ce type de mélange synthétique. En effet, la famille Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) est capable de produire des HDL reconstituées suffisamment stables pour être purifiées. La caractérisation de ces HDL reconstituées montre que les complexes obtenus possèdent des caractéristiques éloignées de ceux produits avec l'apoA-I native ou le trimère apoA-I [145-183]. Il est vraisemblable que la dégénérescence appliquée à la séquence 145-183 de l'apoA-I humaine a entraîné des conséquences importantes, à la fois au niveau de la structure et de l'amphipathicité de certains motifs peptidiques de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183). Un autre problème majeur peut également provenir de la région 163-167 qui correspond, dans le fragment de l'apoA-I humaine, à une zone flexible qui permet le positionnement antiparallèle des 2 hélices (voir chap. III.2.2). Une dégénérescence trop importante de ce domaine peut avoir conduit à la suppression de cette propriété fondamentale du motif structural dans certains peptides de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183). A ce titre, la séquence de l'apoA-I du rat fait apparaître à elle seule des modifications très importantes au niveau de la séquence 163-167 de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183). Le poids de cette dégénérescence est très important car en prenant en compte cette singularité de la séquence du rat (Leu en mélange avec Pro, en position 165), 50% des peptides de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) ont pu voir leur structure bouleversée.

## 7. PERSPECTIVES

En guise de perspective, nous proposons la synthèse d'une seconde construction dégénérée, le peptide Deg<sub>2</sub> (apoA-I 145-183), qui consisterait en une simplification du peptide Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) selon trois critères :

- 1<sup>er</sup> critère : conservation de l' $\alpha$ -hélicité sur la base de la classification de Chou et Fasman<sup>117</sup>
- 2<sup>ème</sup> critère : conservation de l'hydrophobicité sur la base de la classification de Hopp et Woods<sup>280</sup>
- 3<sup>ème</sup> critère : conservation de la zone charnière entre les deux hélices amphipathiques en ne dégénéralant pas la séquence 163-167 de l'apoA-I humaine

Chou et Fasman<sup>117</sup> ont établi un classement des acides aminés naturels en fonction de leur fréquence d'apparition dans les différents éléments de structure secondaire de protéines dont la structure tridimensionnelle est connue (**Tableau 16**). Pour l' $\alpha$ -hélicité, ils désignent ces différents groupes par les lettres H et h (forts et faibles formateurs d'hélice), I et i (forts et faibles inducteurs d'hélice) et b et B (faibles et forts destructeurs d'hélice). Cette classification a été utilisée pour éliminer de Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183), les résidus appartenant aux catégories B, b et i qui sont susceptibles d'empêcher la structuration d'une partie des régions hélicoïdales des peptides du mélange (1er critère de sélection). Nous avons, en revanche, conservé tous les résidus favorables à la formation des hélices (classes H, h, I), plus le résidu Val (classe i) de manière à conserver un degré de dégénérescence suffisant au niveau des résidus hydrophobes des hélices amphipathiques.

L'échelle d'hydrophobicité de Hopp et Woods<sup>280</sup> résulte d'une modification de l'échelle de Levitt<sup>281</sup> qui propose une classification des acides aminés en fonction des variations des énergies libres de partage entre l'eau et l'éthanol. A partir de cette échelle, une matrice de remplacement des acides aminés selon le critère d'hydrophobicité a été construite (**tableau 17**).

**Tableau 16. Fréquence d'apparition des acides aminés dans une hélice  $\alpha$  selon Chou et Fasman<sup>117</sup>.**

La trame grisée indique les acides aminés qui ont été conservés pour la conception de Deg<sub>2</sub> (apoA-I 145-183). P $\alpha$  est un facteur proportionnel à la fréquence de présence de l'acide aminé considéré dans une hélice  $\alpha$ .

acides aminés	P $\alpha$	Classe
Glu	1,44	H $\alpha$
Ala	1,39	
Met	1,32	
Leu	1,30	
Lys	1,21	h $\alpha$
His	1,12	
Gln	1,12	
Phe	1,11	
Asp	1,06	
Trp	1,03	l $\alpha$
Arg	1,00	
Ile	0,99	i $\alpha$
Val	0,97	
Cys	0,95	
Thr	0,78	
Asn	0,78	
Tyr	0,73	b $\alpha$
Ser	0,72	
Gly	0,63	B $\alpha$
Pro	0,55	

**Tableau 17. Matrice de remplacement des acides aminés établie suivant l'échelle d'hydrophobicité de Hopp et Woods<sup>280</sup>.**

La flèche indique le sens du remplacement.

↔	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
A	0	0	-3	-3	2	0	0	1	-3	1	1	-1	0	-1	-3	-1	0	1	2	1
C	0	0	-3	-3	1	-1	0	1	-3	1	0	-1	-1	-1	-3	-1	0	0	2	1
D	3	3	0	0	4	2	3	4	0	4	3	2	2	2	0	2	3	4	5	4
E	3	3	0	0	4	2	3	4	0	4	3	2	2	2	0	2	3	4	5	4
F	-2	-1	-4	-4	0	-2	-2	-1	-4	-1	-1	-2	-2	-2	-4	-2	-2	-1	1	0
G	0	1	-2	-2	2	0	0	1	-2	1	1	0	0	0	-2	0	0	1	3	2
H	0	0	-3	-3	2	0	0	1	-3	1	1	-1	0	-1	-3	-1	0	1	2	1
I	-1	-1	-4	-4	1	-1	-1	0	-4	0	0	-2	-1	-2	-4	-2	-1	0	1	0
K	3	3	0	0	4	2	3	4	0	4	3	2	2	2	0	2	3	4	5	4
L	-1	-1	-4	-4	1	-1	-1	0	-4	0	0	-2	-1	-2	-4	-2	-1	0	1	0
M	-1	0	-3	-3	1	-1	-1	0	-3	0	0	-1	-1	-1	-3	-1	-1	0	2	1
N	1	1	-2	-2	2	0	1	2	-2	2	1	0	0	0	-2	0	0	1	3	2
P	0	1	-2	-2	2	0	0	1	-2	1	1	0	0	0	-2	0	0	1	3	2
Q	1	1	-2	-2	2	0	1	2	-2	2	1	0	0	0	-2	0	0	1	3	2
R	3	3	0	0	4	2	3	4	0	4	3	2	2	2	0	2	3	4	5	4
S	1	1	-2	-2	2	0	1	2	-2	2	1	0	0	0	-2	0	1	1	3	2
T	0	0	-3	-3	2	0	0	1	-3	1	1	0	0	0	-3	-1	0	1	2	1
V	-1	0	-4	-4	1	-1	-1	0	-4	0	0	-1	-1	-1	-4	-1	-1	0	1	1
W	-2	-2	-5	-5	-1	-3	-2	-1	-5	-1	-2	-3	-3	-3	-5	-3	-2	-1	0	-1
Y	-1	-1	-4	-4	0	-2	-1	0	-4	0	-1	-2	-2	-2	-4	-2	-1	-1	1	0

Cette matrice asymétrique permet de déterminer si le remplacement d'un acide aminé par un autre est favorable ou défavorable à la conservation de l'hydrophobicité à la position considérée. Si la valeur lue est égale ou proche de 0, les deux résidus concernés sont alors considérés comme ayant une hydrophobicité équivalente. Au contraire, si la valeur lue est éloignée de 0 (maximum 5 en valeur absolue), les deux résidus peuvent alors être considérés comme sensiblement différents l'un de l'autre du point de vue de l'hydrophobicité. Le signe de la valeur lue indique si le remplacement est favorable (valeur positive) ou défavorable (valeur négative) à une augmentation de l'hydrophobicité à la position considérée. Afin de souscrire à ce deuxième critère de sélection pour la conception de Deg<sub>2</sub> (apoA-I 145-183), la conservation ou l'élimination de chaque acide aminé constituant Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183) a été examinée en fonction de cette matrice de remplacement. Si, à une position donnée, un des acides du mélange est trop éloigné de l'acide aminé présent dans la séquence de l'apoA-I humaine (indice >2 ou <-2), il est éliminé. Dans le cas contraire, la dégénérescence est conservée. Par exemple, en position 158, le remplacement de l'alanine (présente dans la séquence de l'apoA-I humaine) par un acide glutamique donne l'indice -3 dans la matrice de remplacement. Le résidu Glu induisant un trop grand changement du point de vue de l'hydrophobicité est donc exclu du mélange d'acide aminé en position 158 de la construction Deg<sub>2</sub> (apoA-I 145-183).

Enfin, pour souscrire au troisième critère de sélection, la construction dégénérée Deg<sub>2</sub> (apoA-I 145-183) présente en position 163-167 le motif conservé Leu-Ala-Pro-Tyr-Ser de l'apoA-I humaine.

La composition de la construction Deg<sub>2</sub> (apoA-I 145-183), ainsi conçue est présentée sur la **figure 79**. Le nombre de peptides différents qui composent cette famille, quoique sensiblement réduit par rapport à Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183), reste important (737280). La synthèse d'une telle famille de peptides sur support trimérique devrait posséder une capacité d'association importante avec les phospholipides et former des HDL reconstituées plus du point de vue physico-chimique de celles obtenues avec le trimère apoA-I [145-183] ou avec l'apoA-I native. Si une telle synthèse est réalisée, il conviendra de vérifier, par des études d'association aux lipides et de dichroïsme circulaire, que les peptides constituant cette nouvelle construction possèdent bien une structure et des propriétés comparables à celles du motif hélice-coude-hélice 145-183 de l'apoA-I humaine. Dans ce cas, nous serons alors en possession d'une bibliothèque de peptides convergente du point de vue structural mais néanmoins divergente du point de vue de la séquence primaire. Cette bibliothèque constituerait un outil précieux pour caractériser les processus moléculaires intervenant au niveau de la membrane des cellules lors de l'interaction HDL/cellule périphérique et lors de l'efflux de cholestérol des cellules périphériques.



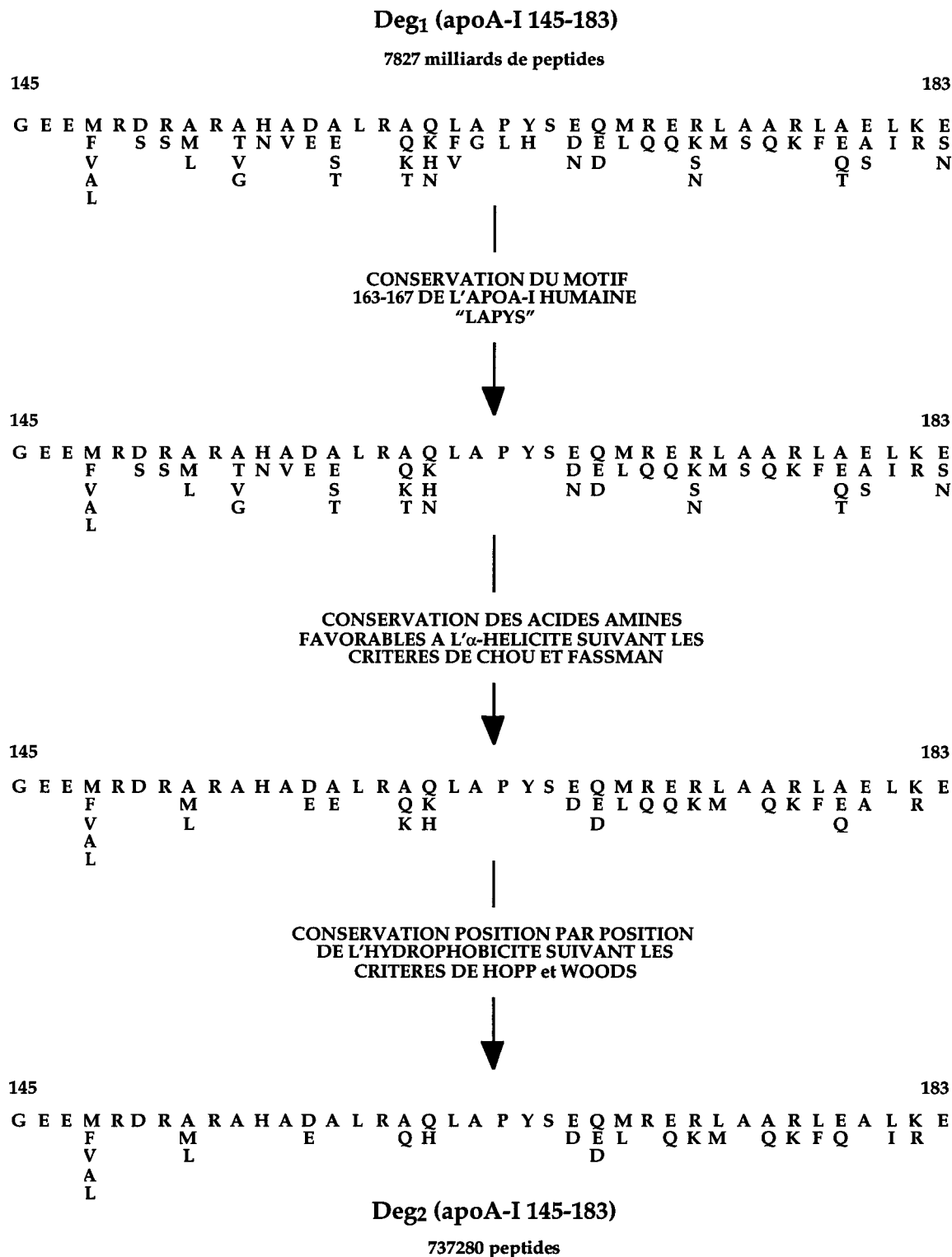


Figure 80. Conception et composition de la construction peptidique Deg<sub>2</sub> (apoA-I 145-183).

## CONCLUSION GENERALE

L'apolipoprotéine A-I constitue la protéine majeure des lipoprotéines de haute densité. Cette apolipoprotéine possède un intérêt physiologique important dans la mesure où le taux de HDL plasmatiques est corrélé négativement avec le risque de maladie cardio-vasculaire. Notre laboratoire, a été le premier à montrer que l'effet protecteur des HDL était dû essentiellement à l'apoA-I et que les HDL contenant uniquement l'apoA-I (et non l'apoA-II) est les plus efficaces dans cette protection<sup>8</sup>. Récemment, l'importance de l'apoA-I a été confirmée par une étude menée sur des souris transgéniques exprimant le gène de l'apoA-I humaine. Cette étude montre que ces souris, possédant normalement une susceptibilité importante vis-à-vis de l'athérosclérose, sont protégées contre la maladie après transfection du gène de l'apoA-I humaine<sup>282</sup>. Il existe par conséquent des preuves *in vivo* et *in vitro* du caractère anti-athérogène de l'apolipoprotéine A-I.

Sur la base de la structure génomique de l'apoA-I, on sait que cette apolipoprotéine contient 8 unités de répétitions de 22-résidus possédant vraisemblablement toutes une partie hélicoïdale amphipathique. La structure spatiale de l'apo A-I n'est pas encore connue, de nombreuses alternatives ont été proposées pour tenter de préciser les relations structure-fonctions de cette apolipoprotéine. Parmi ces différentes approches, la synthèse peptidique a surtout été utilisée dans le but de modéliser les hélices amphipathiques. De nombreux peptides modèles (LAP<sup>243</sup>, Map<sup>283</sup>, 18A et dérivés<sup>140</sup> ...) ne correspondant pas à des séquences natives de l'apoA-I, ont été développés afin de mieux comprendre l'influence de facteurs tels que la distribution des charges sur l'hélice<sup>141,284</sup>, la nature des extrémités des peptides<sup>258</sup> ou l'arrangement des hélices<sup>146</sup>, sur leur capacité à s'associer aux lipides<sup>140</sup> ou encore à activer la LCAT<sup>285</sup>.

A notre connaissance, seules deux études traitent de la capacité de peptides synthétiques issus de la séquence de l'apolipoprotéine A-I humaine à s'associer aux lipides. Une étude assez ancienne concerne les segments 121-164 et 144-165 de l'apoA-I<sup>124</sup>. Elle est antérieure à la mise au point des techniques de reconstitution d'HDL et ne propose, par conséquent, que des mesures d'affinité des peptides vis-à-vis de vésicules unilamellaires de phospholipides. La seconde étude, très récente, concerne la synthèse des huit hélices potentielles de l'apoA-I humaine<sup>147</sup>. Là encore, aucun essai de reconstitution d'HDL n'a été effectué. Le travail exposé dans la première partie de cette thèse constitue donc la seule étude proposant la reconstitution d'HDL à partir de segments synthétiques courts issus de l'apolipoprotéine A-I. Cette étude nous a permis de définir les limites de ces peptides courts dans l'étude de domaines restreints d'apolipoprotéines échangeables dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire liés aux lipides

au sein d'une particule physico-chimiquement proche des HDL reconstituées avec l'apolipoprotéine entière.

Il est maintenant généralement admis qu'il existe une coopérativité entre les hélices amphipathiques lors de l'association de l'apoA-I avec les lipides<sup>140,136</sup>. Cet effet coopératif explique raisonnablement pourquoi les HDL reconstituées avec des peptides courts d'apoA-I ne permettent pas d'obtenir des HDL synthétiques semblables à celles obtenues avec l'apoA-I entière en terme de composition chimique, de taille et de stabilité. La conception et la synthèse d'un modèle original d'apolipoprotéine A-I, basé sur l'association parallèle de plusieurs unités structurales identiques au sein d'une construction dendrimérique, sont également décrites dans cette thèse. De telles constructions sont relativement simples à synthétiser, évolutives et l'obtention de constructions dendrimériques chimiquement caractérisables et purifiables est envisageable par ligation chimio-sélective de fragments prépurifiés. Ces constructions pourraient rapidement permettre l'ouverture de nouvelles voies d'études dans le domaine des apolipoprotéines échangeables. A plus long terme, et à condition de connaître le comportement plasmatique de ces constructions synthétiques, d'autres applications sont peut être envisageables dans le domaine de l'adressage de drogues par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de lipoprotéines.

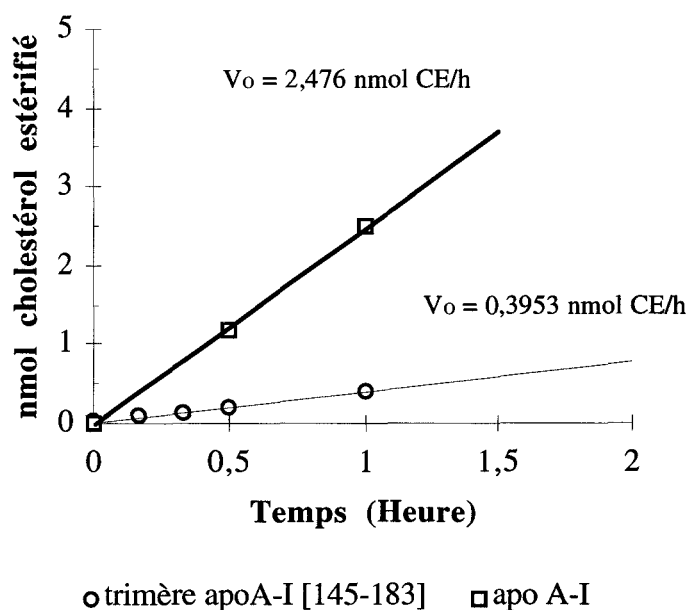
L'application des constructions dendrimériques à la séquence 145-183 de l'apoA-I nous a permis, d'une part, de valider ce modèle (d'autres séquences sont actuellement à l'étude) et, d'autre part, d'étudier les propriétés biologiques de ce domaine isolé dans des conditions physico-chimiques proches de celles de l'apoA-I native au sein des HDL. Les données obtenues montrent que les HDL synthétiques produites avec les constructions dendrimériques apoA-I [145-183] sont capables de reproduire très fidèlement certaines propriétés biologiques de l'apoA-I native telle que la fixation spécifique sur les cellules HeLa. L'analyse des résultats montre que la séquence choisie joue probablement un rôle important dans l'interaction des HDL avec la membrane de ces cellules. Les constructions intégrant la séquence 145-183 de l'apoA-I sont également capables d'induire un efflux de cholestérol d'adipocytes (OB117) ou d'hépatômes dégénérés (FU5AH). Cet efflux est quantitativement comparable à celui obtenu, dans les mêmes conditions, avec l'apoA-I native. Cependant, il existe des différences au niveau cinétique et la vitesse initiale de l'efflux provoqué par les HDL reconstituées avec les constructions dendrimériques apparaît significativement plus élevée. En revanche, l'activation de la LCAT ne semble pas faire partie des propriétés mimétiques des constructions dendrimériques intégrant la séquence 145-183 de l'apolipoprotéine A-I.

Notre travail propose aussi une application de la synthèse combinatoire de peptides dans le domaine des apolipoprotéines. Celle-ci permet de donner naissance, en une seule synthèse, à une famille de peptides apparentés. Les représentants de cette famille dérivent tous d'une

séquence commune mais présentent des dégénérescences ponctuelles représentatives d'un critère donné. L'application proposée dans cette étude, met en jeu la dégénérescence naturelle de l'apolipoprotéine A-I au cours de l'évolution. Les résultats préliminaires ont permis de fixer des limites à la dégénérescence applicable aux hélices amphipathiques de l'apoA-I et de dégager un certain nombre de règles qui permettront vraisemblablement de parvenir, à court terme, à la synthèse d'une famille de peptides possédant des propriétés structurales et physico-chimiques apparentées en s'affranchissant des informations apportées par la séquence.

Pour terminer, rappelons que les segments hélicoïdaux d'autres apolipoprotéines échangeables présentent des homologies structurales importantes avec le segment 145-183 de l'apolipoprotéine A-I. C'est pourquoi, nous pensons que les constructions dendrimériques décrites dans cette thèse peuvent constituer un outil original pour l'étude des relations structure-fonctions de domaines issus d'autres apolipoprotéines telles que l'apoA-II, l'apoA-IV, l'apo E, ou l'apo C.

Le pourcentage d'estérification du cholestérol induit par la LCAT au sein des particules reconstituées avec le trimère apoA-I [145-183] (exprimé en fonction du temps de réaction) est indiqué sur la **figure 65**. En 24 heures, ces particules sont capable d'estérifier de 54 à 58 % du cholestérol total contenu dans le réacteur. Ce résultat est cependant inférieur à celui obtenu avec les HDL reconstituées avec l'apoA-I native qui estérifient 90 à 95 % du cholestérol dans les mêmes conditions. La partie initiale de cette courbe (**figure 66**) est linéaire et permet de calculer la vitesse initiale d'estérification ( $V_0$ ) de chacune des 2 populations de complexes. Cette vitesse initiale déterminée dans cette étude avec l'apoA-I native (2,476 nmol de CE par heure) est comparable aux valeurs trouvées dans la littérature<sup>Erreur! Signet non défini.</sup>. Lorsque le trimère apoA-I [145-183] est utilisé pour activer l'enzyme, la vitesse initiale (0,395 nmole de CE par heure) est 6 fois moins importante qu'avec l'apoA-I native. Il apparaît donc que, dans les conditions expérimentales choisies, la construction trimérique apoA-I [145-183] constitue un activateur moins performant de la LCAT.



**Figure 66. Détermination de la vitesse initiale de la LCAT lorsque le trimère apoA-I [145-183] ou l'apoA-I native sont utilisés comme activateur de l'enzyme.**

CE : cholestérol estérifié

## 6. DISCUSSION

L'étude de l'immunoréactivité des HDL reconstituées avec les constructions dendrimériques vis-à-vis d'anticorps monoclonaux a tout d'abord permis de confirmer la

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Uemura K., and Piza Z., (1985). Tendences récentes de la mortalité par maladies cardiovasculaires dans 27 pays industrialisés. *Rapp. trimest. Statist. Sanit. Mond., OMS*, 38, n°2.
2. Lopez A.D., (1993). Assessing the burden of mortality from cardiovascular diseases. *Rapp. trimest. Statist. Sanit. Mond.*, 46, 91-99.
3. Wielgosz A. T., (1993). The decline in cardiovascular health in developing countries. *Rapp. trimest. Statist. Sanit. Mond.*, 46, 91-99.
4. Brown M.S., and Goldstein J.L., (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.*, 232, 34-47.
5. Miller G.J., and Miller N.E., (1975). Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischæmic heart disease. *Lancet*, 1, 16-19.
6. Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C., Kannel W.B., and Dawber T.R., (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *Am. J. Med.*, 62, 707-714.
7. Miller N.E., Forte O.H., Thelle D.S., and Mjos O.D., (1977). The thromsoheart study : high-density lipoprotein and coronary heart disease : a prospective case control study. *Lancet*, 1, 965-968.
8. Puchois P., Kandoussi A., Fievet P., Fourrier J.L., Bertrand M., Koren E., and Fruchart J.C., (1987). ApoA-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis.*, 68, 35-40.
9. Gordon D.J. and Rifkind B.M., (1989). High density lipoprotein - the clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med.*, 321, 1311-1316.
10. Tall A.R., (1990). Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J. clin. Invest.*, 86, 379-384.
11. Fielding C.J., Shore V.G., and Fielding P.E., (1972). A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyl transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46 1493-1498.
12. Fidge N.H., Nestel P.J, and Suzuki N., (1983). Comparison of binding and degradation of high density lipoprotein by intestinal mucosal cells, fibroblasts and adrenal cortical cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, 753, 14-21.
13. Biesbroek R., Oram J.F., Albers J.J., and Bierman E.L.,(1983). Specific high affinity binding of high density lipoproteins to cultured human skin fibroblasts and arterial smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 71, 525-539.
14. Graham D.L., and Oram J.F., (1987). Identification and characterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membranes by liguand blotting. *J. Biol. Chem.*, 262, 7439-7442.
15. Hwang J., and Menon K.M., (1985). Binding of apolipoprotein A-I and A-II after recombination with phospholipid vesicles to the high density lipoprotein receptor of luteinized rat ovary. *J. Biol. Chem.*, 260, 5660-5668.
16. Fong B.S., Salter A.M., Jimenez J., and Angel A., (1987). The role of apolipoprotein AI and apolipoprotein AII in high density lipoproteins binding to human adipocyte plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 920, 105-113.

17. Fidge N.H., and Nestel P.J., (1985). Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human HDL<sub>3</sub> with receptors on cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 3570-3575.
18. Sviridov D., Pyle L., and Fidge N., (1996). Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the efflux of intracellular cholesterol to human serum and apolipoprotein A-I containing particles. *Biochemistry*, 35, 189-196.
19. Von Eckardstein A., Castro G., Wybranska I., Theret N., Duchateau P., Duverger N., Fruchart J.C., Ailhaud G., and Assmann G., (1991). Interaction of reconstituted high density lipoprotein discs containing human apolipoprotein A-I variants with murine adipocytes and macrophages: evidence for reduced cholesterol efflux promotion by apo A-I(Pro165->Arg). *J. Biol. Chem.* 268, 2616-2622.
20. Luchoomun J., Theret N., Clavey V., Duchateau P., Rosseneu M., Brasseur R., Deneffe P., Fruchart J.C., and Castro G.R., (1994). Structural domain of apolipoprotein A-I involved in its interaction with cells. *Biochim. Biophys. Acta* , 1212, 319-326.
21. Leblond L., and Marcel Y., (1991). The amphiphatic  $\alpha$ -helical repeats of apolipoprotein A-I are responsible for binding of high density lipoproteins to HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, 266, 6058-6067.
22. Vadiveloo P.K., Allan C.M., Brendon J.M., Murray B.J., and Fidge N.H., (1993). Interaction of apolipoprotein A-II with the putative high density lipoprotein receptor. *Biochemistry*, 32, 9480-9485.
23. Jonas A., (1986). Reconstitution of high-density lipoproteins. *Methods Enzymol.*, 128, 553-582.
24. Marcel Y.L., Provost P.R., Koa H., Raffai E., Vu Dac N., Fruchart J.C., and Rassart E., (1991). The epitopes of apolipoprotein A-I define distinct structural domains including a mobile middle region. *J Biol. Chem.*, 266, 3644-3653.
25. Macheboeuf M., (1929). Recherches sur les phosphoaminolipides et stérides du sérum et du plasma sanguins; entraînement des phospholipides, des stérols et des stérides par divers fractions au cours du fractionnement des protéines du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 11, 268-293.
26. Assman G., and Brewer H.B. Jr, (1974). A molecular model of high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71, 989-993.
27. Segrest J.P., Jackson R.L., Morisset J.D., and Gotto A.M., (1974). A molecular theory of lipid-protein interaction in plasma lipoproteins. *FEBS Lett.*, 38, 247-253.
28. Gofman J.W., Lindgren F.T., and Elliot H., (1949). Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J. Biol. Chem.*, 179, 973-978.
29. Kostner G.M., and Laggner P., (1989). Chemical and physical properties of lipoproteins. In *Human plasma lipoprotein*, Walter de Gruyter Ed., Berlin-New York, chap. 2., 23-51.
30. Schmitz G., and Williamson E., (1991). High density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and membrane protection. *Current opinion in lipidology*, 2, 177-189.
31. Eggerman T.L., Hoeg J.M., Tombraegel A., Gregg R.E., and Brewer H.B.Jr., (1988). Selective expression of apolipoprotein A-I and not apolipoprotein A-II in human small intestine. *Arteriosclerosis*, 8, 570a.
32. Lackner K.J., Law S.W., and Brewer H.B.Jr., (1985). The human apolipoprotein A-II gene: complete nucleic acid sequence and genomic organization. *Nucl. Acids Res.*, 13, 4593-4608.

33. Hussain M.M., and Zannis V.I., (1990). Intracellular modification of human apolipoprotein A-II (Apo-II) and sites of apo-AII mRNA synthesis: comparison of apoA-II with apoC-II and apoC-III isoproteins. *Biochemistry*, 29, 209-217.
34. Jahn C.E., Osborne J.C., Schaeffer E.J., Brewer H.B.Jr., (1983). Activation of the enzymatic activity of hepatic lipase by apolipoprotein AII. *Eur. J. Biochem.*, 131, 25-29.
35. Jonas A., Sweeny S.A., and Herbert P.N., (1984). Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with their lipids and their reactions with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 259, 6369-6375.
36. Fruchart J.C., De Geteire C., Delfly B., and Castro G.R., (1994). Apolipoprotein A-I-containing particles and reverse cholesterol transport: evidence for connection between cholesterol efflux and atherosclerosis risk. *Artherosclerosis*, 110 (suppl.), S35-S39.
37. Elshourbagy N.A., Walker D.W., Boguski M.S., Gordon J.I., and Taylor J.M., (1986). The nucleotide and derived amino acid sequence of human apolipoprotein A-IV mRNA and the close linkage of its gene to the genes of apolipoprotein A-I and C-III. *J. Biol. Chem.*, 261, 1998-2002.
38. Hayashi H., Nutting D.F., Fujimoto K., Cardeli J.A., Black D., and Tso P., (1990). Transport of lipid and apolipoproteins A-I and A-IV in intestinal lymph of the rat. *J. Lipid res.*, 31, 1613-1625.
39. Magun A.M., Brasitus T.A., and Glickman R.M., (1985). Isolation of high density lipoproteins from rat epithelial intestinal cells. *J. Clin. Invest.*, 75, 209-218.
40. Stein O., Stein Y., Lefebvre M., and Roheim P.S., (1986). The role of apolipoprotein A-IV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 878, 7-13.
41. Steinmetz A., Barbaras R., Ghalim N., Clavey V., Fruchart J.C., and Ailhaud C., (1990). Human apolipoprotein A-IV binds to A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.*, 265, 7859-7863.
42. Steinmetz A., and Utermann G., (1985). Activation of lecithin:cholesterol acyl transferase by human apolipoprotein A-IV. *J. Biol. Chem.*, 260, 2258-2264.
43. Jonas A., (1986). Synthetic substrates of lecithin:cholesterol acyl transferase. *J. Lipid Res*, 27, 689-698.
44. Goldberg I.J., Scheraldi C.A., Yacoub L.K., Saxena U., and Bisgaier C.L., (1990). Lipoprotein apo C-II activation of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.*, 265, 4266-4270.
45. Rall S.C., Weisgraber K.H., and Malhey R.W., (1982). Human apo-E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, 257, 4171-4178.
46. Blue M.L., Williams D.L., Zucker S., Khan S.A., and Blum C.B., (1983). Apo E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 283-287.
47. Werb Z., and Chin J. R., (1983). Onset of apoprotein E secretion during differentiation of mouse bone marrow-derived mononuclear phagocytes. *J Cell Biol*, 97, 1113-1118.
48. Goldstein J.L., Kita T., and Brown M.S., (1983). Defective lipoproteins receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N. Eng. J. Med.*, 309, 288-296.
49. Brown S.A., and Goldstein J.L., (1983). Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. Invest.*, 72, 743-747.



50. Takahashi S., Kawarabayasi Y., Nakai T., Sakai J., and Yamamoto T., (1992). Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 9252-9256.
51. Jackson R.L., Sparrow J.T., Baker H.N., Morrisett J.D., Taunton O.D., and Gotto A.M., (1974). The primary structure of apolipoprotein-serine. *J. Biol. Chem.*, 249, 5308-5313.
52. Myklebost O., Williamson B., Markham A.F., Myklebost S.R., Rogers J., Woods D.E., and Humphries S.E., (1984). The isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein CII. *J. Biol. Chem.*, 259, 4401-4404.
53. Karathanasis S.K., Zannis V.I., and Breslow J.L., (1985). Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to two different human apo CIII alleles. *J. Lipid Res.*, 26, 451-456.
54. Soutar A.K., Garner G.E., Baker G.N., Sparrow J, Jackson R.L., Gotta A.M. Jr., and Smith L.C., (1975). Effects of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*, 14, 3057-3064.
55. Bengtsson G., and Olivecrona T., (1980). Lipoprotein lipase: some effect of activator proteins. *Eur J. Biochem.*, 106, 549-555.
56. Glomset J.A., (1972). Plasma LCAT. In *Blood lipids and lipoproteins*, (G. Nelson Ed.). Wiley-New york, 745-787.
57. Drayna D., Jarnagin A.S., Mc Lean J., Henzel W., Kohr W., Fielding C., and Lawn R., (1987). Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature*, 327, 632.
58. Day J.R., Albers J.J., Lofton-Day C.E., Gilbert T.L., Ching A.F.T., Grant F.J., O'Hara P.J., Marco-vina S.M. , and Adolphson J.L., (1994). Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 269, 9388-9391.
59. Lusa S., Jauhiainen M., Metso J., Somerharju P., and Ehnholm C., (1996). The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem. J.*, 313, 275-282.
60. Gofman J.W., De Lalla O., Glazier F., Freeman N.K., Lindgren F.T., Nichols A.V., Strisower E.H., and Tramplin A.R., (1954). The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary artery disease. *Plasma*, 2, 413-484.
61. Weisgraber K.H., and Mahley R.W., (1980). Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-sepharose affinity chromatography. *J. Lipid Res.*, 21, 316-325.
62. Schmitz G., and Assmann G., (1982). Isolation of human serum HDL1 by zonal ultracentrifugation. *J. Lipid Res.*, 23, 903-910.
63. Oschry Y., and Eisenberg S., (1982). Rat plasma lipoproteins: re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity. *J. Lipid Res.*, 23, 1099-1106.
64. Alaupovic P., (1980). The concepts, classification systems and nomenclatures of human plasma lipoproteins. In *CRC Handbook of electrophoresis, Volume I, Lipoproteins: Basic Principles and Concepts*. L.A. Lewis and J.J. Oppl, editors. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 27-46.

65. Cheung M.C., Wolf A.C., Lum K.D., Tollefson J.H., and Albers J.J., (1986). Distribution and localization of lecithin: cholesterol acyl transferase and cholesteryl ester transfer activity in A-I containing lipoprotein. *J. Lipid Res.*, 27, 1135-1144.
66. Fielding P.E., and Fielding C.J., (1980). A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3327-3330.
67. Lagocki P.A., and Scanu A.M., (1980). In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein: displacement of apolipoprotein AI from high density lipoprotein by apolipoprotein AII. *J. Biol. Chem.*, 255, 3701-3706.
68. Delamatre J.G., Wolfbauer G., Philips M.C., and Rothblat G.H., (1986). Role of apolipoproteins in cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta*, 875, 419-428.
69. Cheung M.C., and Albers J.J.,(1984). Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-II and particles containing apolipoprotein A-I but no apolipoprotein A-II. *J. Lipid Res.*, 25, 12201-12209.
70. Castro G.R., and Fielding C.J., (1988). Early incorporation of cell-derived cholesterol into prebeta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry*, 27, 25-29.
71. Shepherd J. and Packard C.J., (1989). In Human plasma lipoproteins. Fruchart J.C. and Shepherd J., editors. Walter de Gruyter, Berlin-New York., 55-78.
72. Green P.H.R, and Glickman R.M., (1981). Intestinal lipoproteins metabolism. *J. Lipid Res.*, 22, 1153-1173.
73. Hamilton R.L., Williams M.C., Fielding C.J., and Havel R.J., (1976). Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, 58, 657-680.
74. Hara H., and Yokoyama S., (1991). Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 265, 20044-20050.
75. Wong L., Curtiss L. K., Huang J., Mann C. J., Maldonado B., and Roheim P. S., (1992). Altered epitope expression of human interstitial fluid apolipoprotein A-I reduces its ability to activate lecithin cholesterol acyl transferase. *J. Clin. Invest.*, 90, 2370-2375.
76. Fielding C.J., and Fielding P.E., (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.*, 36, 211-228.
77. Francone O.L., Fielding C.J., and Fielding P.E., (1990). Distribution of cell-derived cholesterol among plasma lipoproteins: a comparison of three techniques. *J. Lipid Res.*, 31, 2195-2200.
78. Schroeder F. and Nemezc G., (1990). Transmembrane cholesterol distribution. In *Advances in cholesterol research*. M. Esfahani, and Swaney J.B., editors. Telford Press Caldwell N.J., 47-87.
79. Treistman S.N., Moynihan M.M., Wolf D.E., (1987). Influence of alcohols, temperature, and region on the mobility of lipids in neuronal membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 898, 109-120.
80. Curtain C.C., Gordon L.M., and Aloia R.C., (1988). Lipid domains in biological membranes: conceptual development and significance. In Aloia R.C, Curtain C.C., Gordon L.M., Eds. *Advance in membrane fluidity*. New York: Alan R. Liss Inc, Vol 2, 17-42.

81. Schroeder F., Jefferson J.R., Kier A.B., Knittel J., Scallen T.J., Wood W.G., and Hapala I., (1991). Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 196, 235-252.
82. Yechiel E. and Edidin M., (1987). Micrometer-scale domains in fibroblaste plasma membranes. *J. Cell. Biol.*, 105, 755-760.
83. Jefferson J.R., Slotte P., Nemezc G., Pastuszyn A., Scallen T.J., and Schroeder F., (1991). Intracellular sterol distribution in transfected mouse L-cell fibroblasts expressing rat liver fatty acid binding protein. *J. Biol. Chem.*, 266, 5486-5496.
84. McLean L.R., and Phillips M., (1981). Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or tansfert between unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 20, 2893-2900.
85. Phillips M.C., Johnson W.J., and Rothblat G.H., (1987). Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 906, 223-276.
86. Johnson W.J., Mahlberg F.H., Rothblat G.H., and Phillips M.C., (1991). Cholesterol transport between cells and high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1085, 273-298.
87. Davidson W.S., Lund-Katz S., Johnson W.J., Anantharamaiah G.M., Palgunachari N., Segrest J.P., Rothblat G.H., and Phillips M.C., (1994). The influence of apolipoprotein structure on the efflux of cellular free cholesterol to high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 269, 22975-22982.
88. Rothblat G.H., Malhberg W.J., Johnson W.J., and Phillips M., (1992). Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J. Lipid Res.*, 33, 1091-1097.
89. Brouillette C.G., Jones J.L., Ng T.C., Kercret H., Chung B.H., and Segrest J.P., (1984). Structural studies of apolipoprotein A-I/phosphatidylcholine recombinants by high field proton NMR, nondenaturing gradient gel electrophoresis and electron microscopy. *Biochemistry*, 23, 359-367.
90. Tabas I., and Tall A.R., (1984). Mechanism of the association of HDL<sub>3</sub> with endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 259, 13897-13905.
91. Fielding P.E., and Fielding C.J., (1995). Plasma membrane caveole mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry*, 34, 14288-14292.
92. Oram J.F., Mendez A.J., Slotte J.P., and Johnson T.F., (1991). High density lipoprotein apoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol loaded fibroblasts. *Arterioscl. Thromb.*, 11, 403-414.
93. Mendez A.J., Oram J.F., and Bierman E.L., (1991). Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 266, 10104-10111.
94. Barkia A., Puchois P., Ghalim N., Torpier G., Barbaras R., Ailhaud G., and Fruchart J.C., (1991). Differential role of apolipoprotein A-I containing particles in cholesterol efflux from adipose cells. *Atherosclerosis*, 87, 135-146.
95. Kawano M., Miida T., Fielding C.J., and Fielding P.E., (1993). Quantitation of prebeta-HDL-dependent and non specific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochemistry*, 32, 5025-5028.

96. Fielding C.J., and Moser K., (1982). Evidence for the separation of albumin- and apo A-I dependent mechanism of cholesterol efflux from cultured fibroblasts into human plasma. *J. Biol. Chem.*, 257, 10955-10960.
97. Glomset J.A., Norum K.R., Gjone E., (1983). Familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency . In the metabolic basis of inherited disease. (J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson, eds), McGraw-Hill, New york, 943-954.
98. Green P.H.R., Tall A.R., and Glickman R.M., (1978). Rat intestin secretes discoidal high density lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, 61, 528-534.
99. Au-Young J., and Fielding J.C., (1992). Synthesis and secretion of wild type and mutant plasma cholesteryl ester transfer protein in baculo virus-transfected insect cells: the carboxy terminal region is required for both lipoprotein binding and catalysis of transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4094-4098.
100. Mann C.J., Yen F.T., Grant A.M., and Bihain B.E.,(1991). Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.*, 88, 2059-2066.
101. Fukasawa M., Arai H., and Inoue K., (1992). Establishment of anti human cholesteryl ester transfer protein monoclonal antibodies and radioimmunoassay of the level of cholesteryl ester transfer protein in human plasma. *J. Biochem.*, 111, 696-698.
102. Schneider W.J., (1991). Removal of lipoproteins from plasma. In *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Vance D.E., and Vance J., editors. Elsevier Press, Amsterdam, 461-487.
103. Pitas R.E., Innerarity T.L., Arnold K.S., and Mahley R.W., (1979). Rate and equilibrium constants for binding of apo E HDLc (a cholesterol induced lipoprotein) and low density lipoproteins to human fibroblasts: evidence for multiple receptor binding of apo E HDLc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76, 2311-2315.
104. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., and Krieger M., (1996). Identification of scavenger receptor SR-Bi as a high density lipoprotein receptor, *Science*, 271, 518-520.
105. Rifichi V.A., and Eder H.A., (1984). A hepatocyte receptor for high density lipoprotein specific for apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.*, 259, 13814-13818.
106. Barbaras R., Collet X., Chap H., and Perret B., (1994). Specific binding of free apolipoprotein A-I to a high-affinity binding site on Hep G2 cells: characterization of two high-density lipoprotein sites. *Biochemistry*, 33, 2335-2340.
107. Dashti N., Wolfbauer G., and Alaupovic P., (1985). Binding and degradation of human high density lipoproteins of human hepatosoma cell line Hep G2. *Biochim. Biophys. Acta*, 853, 100-110.
108. Brewer H.B.Jr., Fairwell T., Larue A., Ronan R., Houser A., and Bronzert T.J., (1978). The amino acid sequence of human apo AI and apolipoprotein isolated from high density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 623-630.
109. Law S.W., and Brewer H.B.Jr., (1984). Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human apolipoprotein A-I mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 66-70.
110. Law S.W., Gray G., and Brewer H.B.Jr., (1983). cDNA cloning of human apo A-I: amino acid sequence of preapo A-I. *Biochim. Biophys. Res., Commun.*, 112, 257-264.
111. Scanu A.M., (1987). Proapolipoprotein lipoprotein converting enzymes and high density lipoproteins early events in biogenesis. *American Heart J.*, 113, 527-531.

112. Luo C.C., Li W.H., Moore M.N., and Chan L., (1986). Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family. *J. Mol. Biol.*, 187, 325-340.
113. Barker W.C., and Dayhoff M.O., (1977). Evolution of lipoproteins deduced from protein sequence data. *Comp. Biochem. Physiol.*, 576,309-315.
114. McLachlan A.D., (1977). Repeated helical pattern in apolipoprotein A-I. *Nature*, 267, 465-466.
115. Brouillette C.G., and Anantharamaiah G.M., (1995). Structural models of apolipoprotein A-I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1256, 103-129.
116. Wilson C., Wardell M.R., Weissgraber K.H., Malhey R.W., and Agard D.A., (1991). Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, 252, 1817-1822.
117. Chou P.Y., and Fasman G.D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry*,13, 222-227.
118. Garnier J., Osguthorpe D.J., and Robson B., (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 120, 97-120.
119. Schiffer J., and Edmundson A.B., (1967). Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.*, 7, 121-135.
120. Segrest J.P., De Loof H., Dohlman J.G., Brouillette C.G., and Anantharamaiah G.M., (1990). Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins: Struct. Funct. Gen.*, 8, 103-117.
121. 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.
122. Holvoet P., Zhao Z., Vanloo B., Vos R., Deridder E., Dhoest A., Taveirne J., Brouwers E., Demarsin E., Engelborghs Y., Rosseneu M., Collen D., and Bresseur R., (1995). Phospholipid binding and lecithin-cholesterol acyltransferase activation properties of apolipoprotein A-I mutants. *Biochemistry*, 34, 13334-13342.
123. Leroy A., Harms Toohill K.L., Fruchart J.C., and Jonas A., (1993). Structural properties of high density lipoprotein subclasses homogeneous in protein composition and size. *J. Biol. Chem.*, 268, 4798-4805.
124. Fukushima D., Yokoyama S., Kroon D.J., Kézdy F.J., and Kaiser E.T. (1980). Chain length-correlation of amphiphilic peptides. *J. Biol. Chem.*, 255, 10651-10657.
125. Wetterau J.R., and Jonas A., (1982). Factors affecting the size of complexes of dipalmitoyl phosphatidylcholine with human apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.*, 258, 2637-2643.
126. Jonas A., Hefele Wald J., Harms Toohill K.L., Krul E.S., and Kézdy E., (1990). Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 265, 22123-22129.
127. Compton L.A., and Johnson W.C., (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.*, 155, 155-167.
128. Leroy A., Lippens G., Wieruszkeski J.M., Parra H.J., and Fruchart J.C., (1995). Native like structure of apoA-I in a n-propanol/water solution as determined by <sup>13</sup>C NMR. *FEBS Letters*, 361, 29-34.

129. Jones M.K., Anantharamaiah G.M., and Segrest J.P., (1992). Computer programs to identify and classify amphipathic  $\alpha$  helical domains. *J. Lipid Res.*, 33, 287-296.
130. Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Brouillette 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.
131. Segrest J.P., Garber D.W., Brouillette C.G., Harvey S.C., and Anantharamaiah G.M., (1994). The amphipathic  $\alpha$  helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv. Prot. Chem.*, 45, 303-370.
132. Brasseur R., (1991). Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J. Biol. Chem.*, 266, 16120-16127.
133. Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M., and Wall R., (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.*, 179, 125-142.
134. Brasseur R., De Meutter J., Vanloo B., Goormaghtigh E., Ruyschaert J.M., and Rosseneu M., (1990). Mode of assembly of amphipathic helical segments in model high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1043, 245-252.
135. Rosseneu M., Vanloo B., Lins L., Corijn J., Van Biervliet J.P., Ruyschaert J.M., and Brasseur R., (1992). Contribution of helix-helix interactions to the stability of apolipoprotein-lipid complexes. In "High density lipoproteins and atherosclerosis III". Miller N.E. and Tall A.R., ed. Amsterdam : Elsevier Sci., 105-113.
136. Lins L., Brasseur R., De Pauw M., Van Biervliet J. P., Ruyschaert J. M., Rosseneu M., and Vanloo B., (1995). Helix-helix interactions in reconstituted high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1258, 10-18.
137. Nolte R.T., and Atkinson D., (1992). Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. *Biophys. J.*, 63, 1221-1239.
138. Lins L., Piron S., Conrath K., Vanloo B., Brasseur R., Rosseneu M., Baert J., and Ruyschaert (1993). Enzymatic hydrolysis of reconstituted dimyristoylphosphatidylcholine-apoA-I complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1151, 137-142.
139. Jackson R.L., Morrisett J.D., Gotto A.M.Jr., and Segrest J.P., (1975). The mechanism of lipid-binding by plasma lipoproteins. *Mol. Cell. Biochem.*, 6, 43-50.
140. Kanellis P., Romans A.Y., Johnson B.J., Kercret H., Chiovetti R. Jr., Allen T.M. and Segrest J.P., (1980). Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Effect of charged amino acid residue topography on lipid affinity. *J. Biol. Chem.*, 255, 11464-11472.
141. Corijn J., Deleys R., Labeur C., Vanloo B., Lins L., Brasseur R., Baert J., Ruyschaert J.M., and Rosseneu M., (1993). Synthetic model peptides for apolipoproteins. II. Characterization of the discoidal complexes generated between phospholipids and synthetic peptides for apolipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1170, 8-16.
142. Brasseur R., Vanloo B., Deleys R., Lins L., Labeur C., Taveirne J., Ruyschaert J.M., and Rosseneu M., (1993). Synthetic model peptides for apolipoproteins. I. Design and properties of synthetic model peptides for the amphipathic helices of the plasma apolipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1170, 1-7.
143. Rozek A., Bushko G.W., and Cushley R.J., (1995). Conformation of two peptides corresponding to human apolipoprotein C-I residues 7-24 and 35-53 in the presence of sodium dodecyl sulfate by CD and NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 34, 7401-7408.

144. Sparrow J.T., Sparrow D.A., Fernando G., Culwell A.R., Kovar M. and Gotto A.M.Jr., (1992). Apolipoprotein E: phospholipid binding studies with synthetic peptides from the carboxyl terminus. *Biochemistry*, 31, 1065-1068.
145. Westerlund J.A., and Weisgraber K.H., (1993). Discrete carboxyl-terminal segments of apolipoprotein E mediate lipoprotein association and protein oligomerization. *J. Biol. Chem.*, 268, 15745-15750.
146. Mishra V.K., Palgunachari M.N., Lund-Kaltz S., Phillips M., Segrest J.P., and Anantharamaiah G.M., (1995). Effect of the arrangement of tandem repeating units of class A amphipathic  $\alpha$ -helixes on lipid interaction. *J. Biol. Chem.*, 270, 1602-1611.
147. 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 height tandem amphipathic helical domains of human apoA-I have significant lipid affinity. *Arteriosclerosis, Tromb. Vasc. Biol.*, 16, 328-338.
148. Thrift R.N., Forte T.M., Cahoon B.E., and Shore V.G., (1986). Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J lipid Res.*, 27, 236-250.
149. Leroy A., and Jonas A., (1994). Native like structure and self-association behavior of apolipoprotein A-I in a water/n-propanol solution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1212, 285-294.
150. Bardeau D.L., Jonas A., Teng T. and Scanu A.M., (1979). Asymmetry of apolipoprotein A-I in solution as assessed from ultracentrifugal, viscometric, and fluorescence polarization studies. *Biochemistry*, 18, 362-369.
151. Jonas A., (1992). In *Structure and function of apolipoproteins*, (Rosseneu M. ed.), CRC Press, Boca Raton, 217-250.
152. Jonas A., Krajnovitch D.J., and patterson B.W., (1977). Physical properties of isolated complexes of human and bovine A-I apolipoproteins with L- $\alpha$ -dimyristoyl phosphatidylcholine. *J Biol. Chem.*, 252, 2200-2005.
153. Swaney J.B., (1980). Properties of lipid-apolipoprotein association products. *J. Biol. Chem.*, 255, 877-881.
154. Bonomo E.A., and Swaney J.B., (1988). A rapid method for the synthesis of protein-lipid complexes using adsorption chromatography. *J. Lipid. Res.*, 29, 380-384.
155. Matz C.E., and Jonas A., (1982). Reaction of human lecithin cholesterol acyltransferase with synthetic micellar complexes of apolipoprotein A-I, phosphatidylcholine, and cholesterol. *J.Biol. Chem.*, 257, 4535-4540.
156. Dalton M.A. and Swaney J.B., (1993). Structural and functional domains of apolipoprotein A-I within high density lipoproteins. *J Biol. Chem.*, 268, 19274-19283.
157. Sparks D.L., Davidson W.S., Lund-Katz S., and Phillips M.C., (1993) Effect of cholesterol on the charge and structure of apolipoprotein A-I in recombinant high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.*, 268, 23250-23257.
158. Jonas A., Kezdy K.E., and Hefele Wald J.H., (1989). Defined apolipoprotein A-I conformation in reconstituted high density lipoprotein discs. *J. Biol. Chem.*, 264, 4818-4824.
159. Rye K.A., Garrety K.H., and Barter P.J., (1993). Preparation and characterization of spheroidal, reconstituted high-density lipoproteins with apolipoprotein A-I only or with apolipoprotein A-I and A-II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1167, 316-325.
160. Cheung M.C., Segrest J.P., Albers J.J., Cone J.T., Brouillette C.G., Hong Chung B., Kashyap M., Glasscock A., and Anantharamaiah G.M., (1987). Characterization of high

density lipoprotein subspecies: structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunoaffinity chromatography. *J. Lipid Res.*, 28, 913-929.

161. Breiter D.R., Kanost M.R., Benning M.M., Wesenberg G., Kaw J.H., Wells M.A., Rayment I., and Holden H.M., (1991). Molecular structure of an apolipoprotein determined at 2.5 Å resolution. *Biochemistry*, 30, 603-608.

162. Wald J.H., Goormaghtigh E., De Meutter J., Ruyschaert J.M., and Jonas A., (1990). Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 265, 20044-20050.

163. Curtiss L.K., and Smith R.S., (1988). Localization of two epitopes of apolipoprotein A-I that are exposed on human high density lipoproteins using monoclonal antibodies and synthetic peptides. *J. Biol. Chem.*, 263, 13779-13785.

164. Silberman S.R., Bernini F., Sparrow J.T., Gotto A.M.Jr., and Smith L.C., (1987). Monoclonal antibodies as probes of high-density lipoprotein structure: identification and localization of a lipid-dependent epitope. *Biochemistry*, 26, 5833-5843.

165. Calabresi L., Meng Q-H., Castro G.R., and Marcel Y.L., (1993). Apolipoprotein A-I conformation in discoidal particles: evidence for alternate structures. *Biochemistry*, 32, 6477-6484.

166. Kunitake S.T., Chen G.C., Kung S-F., Schilling J.W., Hardman D.A., and Kane J.P., (1990). Pre-beta high density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, 10, 25-30.

167. Von Eckardstein A., Funke H., Henke A., Altland K., Benninghoven A., and Assmann G., (1989). Apolipoprotein A-I variants. Naturally occurring substitutions of proline residues affect plasma concentration of apolipoprotein A-I. *J. Clin. Invest.*, 84, 1722-1730.

168. Menzel H.J., Assmann G., Rall S.C., Weisgraber K.H.Jr., Mahley R.W., (1984). Human apolipoprotein A-I polymorphism. *J. Biol. Chem.*, 259, 3070-3076.

169. Von Eckardstein A., Funke H., Walter M., Altland K., Benninghoven A., and Assmann G., (1990). Structural analysis of human apolipoprotein A-I variants: amino acids substitutions are nonrandomly distributed throughout the apolipoprotein A-I primary sequence. *J. Biol. Chem.*, 265, 8610-8615.

170. Nichols W.C., Dwulet F.E., Liepnieks F.E., and Benson M.D., (1988). Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156, 763-768.

171. Rall S.C., Weisgraber K.H.Jr., Mahley R.W., Ogawa Y., Fielding C.J., Utermann G., Haas J., Steinmetz A., Menzel H.J., and Assmann G. (1984). Abnormal lecithin:cholesterol acyltransferase activation by a human apolipoprotein A-I variant in which a single lysine residue is deleted. *J. Biol. Chem.*, 259, 10063-10070.

172. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C.Jr., and Weisgraber K.H., (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.*, 25, 1277-1294.

173. Utermann G., Haas J., Steinmetz A., Paetzold R., Rall S.C., Weisgraber K.H.Jr., and Mahley R.W., (1984). Apolipoprotein A-I Giessen (Pro143→Arg). *Eur. J. Biochem.*, 144, 325-331.

174. Weisgraber K.H.Jr., Rall S.C., Bersot T.P., and Mahley R.W., (1983). Apolipoprotein A-I milano: detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *J. Biol. Chem.*, 258, 2508-2513.



175. Jabs H.U., Assmann G., Greifendorf D., and Benninghoven A., (1986). High performance liquid chromatography and time-of-flight secondary ion mass spectrometry: a new dimension in structural analysis of apolipoproteins. *J. Lipid Res.*, 27, 613-621.
176. Takada Y., Sasaki J., Ogata S., Seki M., Teranishi Y., and Arakawa K., (1989). Apolipoprotein A-I (Fukuoka) and A-I (Yame): new genetic variants of apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis*, 9, 707a.
177. Jonas A., Von Eckardstein A., Kézdy K.E., Steinmetz A., and Assman G., (1991). Structural and functional properties of reconstituted high density lipoprotein discs prepared with six apolipoprotein A-I variants. *J. Lipid Res.*, 32, 97-106.
178. Minnich A., Collet X., Roghani A., Cladaras C., Hamilton R.L., Fielding C.J., and Zannis V., (1992). Site-directed Mutagenesis and structure-function analysis of the human apolipoprotein A-I. Relation between lecithin-cholesterol acyltransferase activation and lipid binding. *J. Biol. Chem.*, 267, 16553-16560.
179. Jonas A., von Eckardstein A., Churgay L., Mantulin W.W., and Assmann G., (1993). Structural and functional properties of natural and chemical variants of apolipoprotein A-I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1166, 202-210.
180. Bruhn H., and Stoffel W., (1991). An approach to the functional analysis of lecithin-cholesterol acyltransferase. Activation by recombinant normal and mutagenized apolipoprotein A-I. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 372, 225-234.
181. Chung J., Abano D.A., Fless G.M., and Scanu A.M., (1979). Isolation, properties, and mechanism of in vitro action of lecithin:cholesterol acyl transferase from human plasma. *J. Biol. Chem.*, 254, 7456-7464.
182. Chong K-S., Jahani M., Hara S., and Lacko A.G., (1983). Characterization of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma. III. Chemical properties of the enzyme. *Can. J. Biochem. cell. Biol.*, 61, 875-881.
183. Chong K-S., Hara S., Thompson R.E., and Lacko A.G., (1983). Characterization of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma. II. Physical properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 222, 553-560.
184. Doi Y., and Nishida T., (1983). Microheterogeneity and physical properties of human lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 258, 5840-5846.
185. Subbaiah P.V., Albers J.J., Hong Chen C., and Bagdade J.D., (1980). Low density lipoprotein activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 255, 9275-9280.
186. Czarnecka H., and Yokoyama S., (1993). Regulation of lecithin: cholesterol acyltransferase reaction by acyl acceptors and demonstration of its "idling" reaction. *J. Biol. chem.*, 268, 19334-19340.
187. Jonas A., Covinsky K.E., and Swanney S.A., (1985). Effects of amino group modification in discoidal apolipoprotein A-I-egg phosphatidylcholine-cholesterol complexes on their reactions with lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*, 24, 3508-3513.
188. Jonas A., and McHugh H.T., (1984). Reaction of lecithin:cholesterol acyl transferase with micellar substrates: effect of particle size. *Biochem. Biophys. Acta*, 794, 361-372.
189. Zorich N., Jonas A., and Pownall H., (1985). Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein E in discoidal complexes with lipids. *J. Biol. Chem.*, 260, 8831-8837.

190. Steinmetz A., Kaffarnik H., and Utermann G., (1985). Activation of phosphatidylcholine-sterol acyltransferase by human apolipoprotein E isoforms. *Eur. J. Biochem.*, 152, 747-751.
191. Chen C.H., and Albers J.J., (1985). Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 826, 279-286.
192. Banka C.L., Bonnet D.J., Black A.S., Smith R.S., and Curtiss L.K., (1991). Localization of an apolipoprotein A-I epitope critical for activation of lecithin-cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 266, 23886-23892.
193. Meng Q.H., Calabresi L., Fruchart J-C., and Marcel Y.L., (1993). Apolipoprotein A-I domains involved in the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 268, 16966-16973.
194. Sorci-Thomas M., Kearns M.W., and Lee J.P., (1993). Apolipoprotein A-I domains involved in lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 268, 21403-21409.
195. Quinn D., Shirai K., and Jackson R., (1982) Lipoprotein lipase: mechanism of action and role in lipase metabolism. *Prog. Lipid Res.*, 22, 35-78.
196. Miller A.L., and Smith L.C., (1973). Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein glutamic acid. Formation of a stable surface film. *J. Biol. Chem.*, 248, 3359-3362.
197. Van Tibeurgh H., Sarda L., Verger R., and Cambillau C., (1992). Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature*, 359, 159-162.
198. Bolin D.J., and Jonas A., (1994). Binding of lecithin : cholesterol acyltransferase to reconstituted high density lipoproteins is affected by their lipid but not apolipoprotein composition. *J. Biol. Chem.*, 269, 7429-7434.
199. Hoeg J.M., Demosky S.J., Edge S.B., Gregg R.E., Osborne J.C., and Brewer H.B. Jr., (1985). Characterization of human hepatic receptor for high density lipoproteins. *Arteriosclerosis*, 5, 228-237.
200. Hui D.Y., Innerarity T.L., and Mahley R.W., (1981). Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. *J. Biol. Chem.*, 256, 5646-5655
201. Chacko G.K., (1984). Characterization of high-density lipoprotein binding sites in rat liver and testis membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 795, 417-426.
202. Morisson J.R., Fidge N.H. and Tozuka M., (1991). Determination of the structural domain of apoA-I recognized by high density lipoprotein receptors. *J. Biol. Chem.*, 266, 18780-18785.
203. Morisson J.R., Mc Pherson G.A., and Fidge N.H., (1992). Evidence for two sites on rat liver plasma membranes which interact with high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 267, 13205-13209.
204. Nakai T., Otto P.S., Kennedy D.L., and Whayne T.F.Jr., (1976). Rat high density lipoprotein subfraction (HDL3) uptake and catabolism by isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.*, 251, 4914-4921.
205. Herzyk E., Owen J.S., and Chapman D., (1988). The secondary structure of apolipoproteins in human HDL3 particles after chemical modification of their tyrosine, lysine, cysteine or arginine residues. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta*, 962, 131-142.
206. Bond H.M., Morrone G., Venuta S., and Howell K.E., (1991). Characterization and purification of proteins which bind high-density lipoprotein. *Biochem. J.*, 279, 633-641.

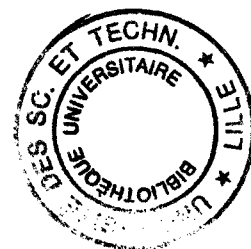
207. Tozuka M., and Fidge N., (1989). Purification and characterization of two high density lipoprotein binding proteins from rat liver recognizing apolipoprotein A-IV. *Biochim. Biophys. Acta*, 1044, 173-175.
208. De Crom R.P.G., Van Haperen R., Willemsen R., and van der Kamp A.W.M., (1992). High density lipoprotein-binding proteins in porcine liver. *Arterioscler. Thromb.*, 12, 325-331.
209. Chen Y-D.I., Kraemer F.B., and Reaven G.M., (1980). Identification of specific high density lipoprotein-binding sites in rat testis and regulation of binding by human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.*, 255, 9162-9167.
210. Vadiveloo P.K., and Fidge N.H., (1992). The role of apoproteins AI and AII in binding of high-density lipoprotein<sub>3</sub> to membranes derived from bovine aortic endothelial cells. *Biochem. J.*, 284, 145-151.
211. Barbaras R., Puchois P., Fuchart J.C., and Ailhaud G., (1987). Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by Lp A-I particles but not by LpA-I:AI. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 63-69.
212. Nowicka G., G., Brüning T., Böttcher A., Kahl G., and Schmitz G., (1990). Macrophage interaction of HDL subclasses separated by free flow isotachopheresis. *J. Lipid Res.*, 31, 1947-1963.
213. Oppenheimer M.J., Oram J.F., and Bierman E.L., (1988). Up-regulation of high density lipoprotein receptor activity by  $\gamma$ -interferon associated with inhibition of cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 263, 19318-19323.
214. Chacko G.K., Mahlberg F.H., and Johnson W.J., (1988). Cross-linking of apoproteins in high density lipoprotein by dimethylsuberimidate inhibits specific lipoprotein binding to membranes. *J. Lipid Res.*, 29, 319-324.
215. Savion N., and Gamliel A., (1988). Binding of apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-IV to cultured bovine aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis*, 8, 178-186.
216. Tauber J-P., Goldminz D., Vlodaysky I., and Gospodarowicz D., (1981). Up-regulation in vascular endothelial cells of binding sites of high density lipoprotein induced by 25-hydroxycholesterol. *Eur. J. Biochem.*, 119, 327-339.
217. Fidge N., Kagami A., and O'Connor M., (1985). Identification of a high density lipoprotein binding protein from adrenocortical membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 129, 759-765.
218. Fidge N.H., (1987). Partial purification of a high density lipoprotein-binding protein from rat liver and kidney membranes. *FEBS Lett.*, 199, 265-268.
219. Monaco L., Bond H.M., Howell K.E., and Cortese R., (1987). A recombinant apo A-I-protein A hybrid reproduces the binding parameters of HDL to its receptor. *EMBO J.*, 6, 3253-3260.
220. Keso L., Lukka M., Ehnolm C., Baumann M., Vihko P., and Olkinuora M., (1987). Apolipoprotein A-I-binding protein from human term placenta. Purification and partial characterisation. *FEBS Lett.*, 215, 105-108.
221. Mendel C.M., Kunitake S.T., Kane J.P., and Kempner E.S., (1988). Radiation inactivation of binding sites for high density lipoproteins in human fibroblast membranes. *J. Biol. Chem.*, 263, 1314-1319.
222. Ferreri K., and Menon K.M.J., (1990). Detection of a 58-kilodalton high density lipoprotein-binding protein in the membrane fraction of luteinized rat ovaries. *Endocrinology*, 126, 2137-2144.

223. Barbaras R., Puchois P., Fruchart J.C., Pradines-Figueres A., and Ailhaud G., (1990). Purification of an apolipoprotein A binding protein from mouse adipose cells. *Biochem. J.*, 269, 767-773.
224. Schmitz G., Robenek H., Lohmann U., and Assmann G., (1985). Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *Embo J.*, 4, 613-622.
225. Schmitz G., Assmann G., Robenek H., and Brennhausen B., (1985). Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6305-6309.
226. Oram J.F., Johnson C.J., and Aulinskas Brown T., (1987). Interaction of high density lipoproteins with its receptor on cultured fibroblast and macrophages. *J. Biol. Chem.*, 262, 2405-2410.
227. Handwerger S., Quardfordt S., Baret J., and Harman L., (1987). Apolipoproteins AI, AII, and CI stimulate placental lactogen release from human placental tissue. A novel action of high density lipoprotein apolipoproteins. *J. Clin. Invest.*, 79, 625-628.
228. Jorgenson E.V., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Gwynne J.T., and Handwerger S., (1989). Synthetic amphipathic peptides resembling apolipoproteins stimulate the release of human placental lactogen. *J. Biol. Chem.*, 264, 9215-9219.
229. Carew T.E., Chapman M.J., Goldstein S., and Steinberg D., (1978). Enhanced degradation of trypsin-treated low density lipoprotein by fibroblasts from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 197-222.
230. Hahn K.S., Tikkanen M.J., Dargar R., Cole T.G., Davie J.M., and Schonfeld G., (1983). Limited proteolysis selectively destroys epitopes on apolipoprotein B in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 24, 877-885.
231. Oram J.F., Brinton E.A., and Bierman E.L., (1983). Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 72, 1611-1621.
232. Lange Y., and Ramos B.V., (1983). Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. *J. Biol. Chem.*, 258, 15130-15134.
233. Jackson R.L., Gotto A.M.Jr., Stein O., and Stein Y., (1975). A comparative study on the removal of cellular lipids from landschütz ascites cells by human apolipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 7204-7209.
234. Slotte J.P., Oram J.F., and Bierman E.L., (1987). Binding of high density lipoproteins to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intracellular membranes to the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 262, 12904-12907.
235. Theret N., Delbart C., Aguié G., Fruchart J.C., Vassaux G., and Ailhaud G., (1990). Cholesterol efflux from adipose cells is coupled to diacylglycerol production and protein kinase C activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173, 1361-1368.
236. Fielding C.J., and Fielding P.E., (1981). Regulation of human plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity by lipoprotein acceptor cholesteryl ester content. *J. Biol. Chem.*, 256, 2102-2104.
237. Schultz J.R., Verstugft J.G., Goug E.L., Nichols A.V., and Rubin E.M., (1993). Protein composition determines the anti-atherogenic properties of high density lipoproteins in transgenic mice. *Nature*, 365, 761.

238. Yancey P.G., Bielcki J.K., Johnson W.J., Lund-Katz, Palgunachari M.N., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Phillips M.C., and Rothblat G.H., (1995). Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. *Biochemistry*, 34, 7955-7965.
239. Åkerlöf E., Jörnvall H., Slotte H., and Pousette Å., (1991). Identification of apolipoprotein AI and immunoglobulin as components of a serum complex that mediates activation of human sperm motility. *Biochemistry*, 30, 8986-8990.
240. Owens R.J., Anantharamaiah G.M., Kalhon J.B., Srinivas R.V., Compans R.W., and Segrest J.P., (1990). Apolipoprotein A-I and its amphipathic helix peptide analogues inhibit human immuno-deficiency virus-induced syncytium formation. *J. Clin. Invest.*, 86, 1142-1150.
241. Srinivas R.V., Venkatachalapathi Y.V., Rui Z., Owens R.J., Gupta K.B., Srinivas S.K., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., and Compans R.W., (1991). Inhibition of virus-induced cell fusion by apolipoprotein A-I and its amphipathic peptide analogs. *J. Cell. Biochem.*, 45, 224-235.
242. Sparrow J.T., and Gotto A.M., (1980). Phospholipid binding studies with synthetic apolipoprotein fragments. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 348, 187-211.
243. Pownall H.J., Hu A., Gotto A.M., Albers J.J., and Sparrow J.T., (1980). Activation of LCAT by a synthetic model lipid-associating peptide. *J. Biol. Chem.*, 255, 3154-3158.
244. Wilmot C.M., and Thornton J.M., (1988). Analysis and prediction of the different types of  $\beta$ -turn in proteins. *J. Mol. Biol.*, 203, 221-232.
245. Nelder, J.A., and Mead R., (1965). A simplex method for function minimization. *Comput. J.*, 7, 308-313.
246. Furet P., Sele A., and Cohen N.C., (1988). *J. Mol. Graphics*, 6, 182-206.
247. Deleers M. and Brasseur R., (1989). Physico-chemical properties of prostaglandins and related pharmacological compounds. A theoretical study on conformational related activity. *Biochem. Pharmacol.*, 38, 2441-2447.
248. Merrifield R.B., (1963). Solid-phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2219.
249. Fields C.G., Lloyd D.H., Macdonald R.L., Otteson K.M., and Noble R.L., (1991). HBTU activation for automated fmoc solid phase peptide synthesis. *Pept. Res.*, 4, 95-101.
250. Shoemaker K.R., Kim P.S., York E.J., Stewart J.M., and Baldwin R.L., (1987). Tests of the helix dipole model for stabilization of  $\alpha$ -helices. *Nature*, 326, 563-567.
251. Fairman R., Shoemaker K.R., York E.J., Stewart J.M., and Baldwin R.L. (1989). Further studies of the helix dipole model: effect of a free  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> or a  $\alpha$ -COO<sup>-</sup> group on helix stability. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 5, 1-7.
252. Tam J.P., Heath W.F., and Merrifield R.B., (1983). SN<sub>2</sub> deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6442-6455.
253. Brewer H.B., Ronan R., Meng M., and Bishop C., (1986). Isolation and characterization of apolipoprotein A-I, A-II, and A-IV., *Methods Enzymol.*, 128, 223-246.
254. Huang, C. (1969). Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8, 344-351.

255. Träuble H., Middelhoff G., and Brown V.W., (1974). Interaction of a serum apolipoprotein with ordered and fluid lipid bilayers correlation between lipid and protein structure. *FEBS Letters*, 49, 269-275.
256. Vanloo B., Taveirne J., Baert J., Lorent G., Lins L., Ruyschaert J.M., and Rosseneu M., (1992). LCAT activation properties of apoA-I CNBr fragments and conversion of discoidal complexes into spherical particles. *Biochem. Biophys. Acta*, 1128, 258-266.
257. Neuhaus D., and Williamson M.P., (1989). *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. Verlag Chemie, New York.
258. Venkatachalapathi Y.V., Phillips M.C., Epanand R.M., Epanand R.F., Tytler E.M., Segrest J.P., and Anantharamaiah G.M., (1993). Effect of end group blockage on the properties of a class A amphipathic helical peptide. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 15, 349-359.
259. Buck M., Radford S.E., and Dobson C.M., (1993). A partially folded state of hen egg white lysozyme in trifluoroethanol: structural characterization and implications for protein folding. *Biochemistry*, 32, 669-678.
260. Lotan N., Berger A., and Katchalski E., (1972). Conformation and conformational transitions of poly- $\alpha$ -amino acids in solution. *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 869-902.
261. Blanco F.J., Jimenez M.A., Rico M., Santoro J., and Nieto J.L., (1991). Tendamistat (12-26) fragment. NMR characterization of isolated beta-turn folding intermediates. *Eur. J. Biochem.*, 200, 345-351.
262. Jimenez M.A., Blanco F.J., Rico M., Santoro J., Herranz J., and Nieto J.L., (1992). Periodic properties of proton conformational shifts in isolated protein helices. An experimental study. *Eur. J. Biochem.*, 207, 39-49.
263. Anantharamaiah G.M., Jones J.L., Brouillette C.G., Schmidt C.F., Chung B.H., Hughes T.A., Bhowan A.S. and Segrest J.P., (1985). Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Structure of complexes with dimyristoyl phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.*, 260, 10248-10255.
264. Tam J.P., (1988). Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5409-5413.
265. Tam J.P. and Lu Y-A, (1989). Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9084-9088.
266. Jonas A., Steinmetz A., and Churgay, L., (1993). The number of amphipathic alpha-helical segments of apolipoproteins A-I, E, A-IV determines the size and functional properties of their reconstituted lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.*, 268, 1596-1602.
267. Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., and Merrifield, R.B. (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction, *Anal. Biochem.*, 117, 147-157.
268. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., and Cook P.I., (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, 34, 595-598.
269. Robey F.A., and Fields R.L., (1989). Automated synthesis of N-bromoacetyl-modified peptides for the preparation of synthetic peptide polymers, peptide-protein conjugates, and cyclic peptides. *Analytical Biochemistry*, 177, 373-377.
270. Scheerer W.F., Syverton J.T., and Grey G.O., (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 97, 695.

271. Petersen G.L., (1977). A simplification of the protein assay method of lowry which is more generally applicated. *Anal. Biochem.*, 83, 346-356.
272. Amri E., Dani C., Dolio A., Etienne J., Grimaldi P., and Ailhand G., (1986). Adipose cell differenciation: evidence for two steps process in the polyamide dependant OB1171 clonal line. *Biochem. J.*, 238, 115-122.
273. Reuber M.D., (1961). A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 26, 891-897.
274. De La Moya M., Atger V., Paul J.L., Fournier N., Moatti N., Giral P., Friday K.E., and Rothblat G.H., (1994). A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb.*, 14, 1056-1065.
275. Johnson W.J.,Mahlberg F.H., Chacko G.K., Phillips M.C., and Rothblat G.H., (1986). The influence of cellular and lipoprotein cholesterol contents on the flux of cholesterol between fibroblasts and high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 263, 14099-14106.
276. Reilch D., Hathaway C.B., Sterchi J.M., and Miller N.E., (1991). Lipoproteins of human peripheral lymph. Apolipoprotein A-I-containing lipoprotein with alpha-2 electrophoretic mobility. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21, 638-643.
277. Agnelli G.and Marcel Y.,(1993). Cholesterol efflux from fibroblasts to discoidal lipoproteins with apolipoprotein A-I (LpA-I) increases with particle size but cholesterol transfer from LpA-I to lipoproteins decreases with size. *Biochemistry*, 32, 2643-2649.
278. Davidson W.S., Rodrigueza W.V., Lund-Katz S., Johnson W.J., Rothblat G.H., and Phillips M.C., (1995). Effects of acceptor particle size on the efflux of cellular free cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 270, 17106-17113.
279. Chen Y-H, and Yang J.T., (1971). A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 1285-1291.
280. Hopp T.P., and Wood K.R., (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 3824-3828.
281. Levitt M., (1976). A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. *J. Mol. Biol.*, 104, 59-107.
282. Rubin E.M., Krauss R.M., Spangler E.A., Verstuyft J.C., and Clift S.M., (1991). Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I. *Nature*, 353, 265-267.
283. McLean L.R., and Hagaman K.A., (1993). Kinetics of the interaction of amphipathic  $\alpha$ -helical peptides with phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1167, 289-295.
284. Epand R.M., Surewicz W.K., Hughes D.W., Mantsch H., Segrest J.P., Allen T.M., and Anantharamaiah G.M., (1989). Properties of lipid complexes with amphipathic helix-forming peptides. Role of distribution of peptide charges. 264, 4628-4635.
285. Anantharamaiah G.M., Venkatachalapathi Y.V., Brouillette C.G., and Segrest J.P., (1990). Use of synthetic peptide analogues to localize lecithin:cholesterol acyltransferase activating domain in apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis*, 10, 95-105.



## Fiche Technique N°1

## TEST DE KAISER

## 1- GENERALITES

Le principe de la synthèse peptidique en phase solide a rendu indispensable la mise au point d'une méthode permettant de déterminer la quantité d'acide aminé couplée à chaque étape. En effet, pour éviter la formation de peptides incomplets ou délétés, un maximum de groupements  $\text{NH}_2$  terminaux de la peptidyl-résine en cours d'élongation doivent être couplés à l'acide aminé activé. Ainsi, la détermination du nombre de fonctions aminés terminales n'ayant pas réagies est d'une importance primordiale pour décider de la poursuite de la synthèse ou de la nécessité d'un nouveau couplage de l'acide aminé à la position concernée. En 1970, Kaiser et coll. ont mis au point un test coloré permettant de doser rapidement et de façon très sensible, la quantité de fonctions amines libres d'un peptide sur la résine. Ce test est basé sur la capacité de la ninhydrine à donner naissance à un chromophore pourpre absorbant à 570 nm en présence de fonctions amines primaires libres .

## 2- REACTIFS

Phénol/Ethanol : 80 mg de phénol dans 20 ml d'éthanol absolu.

Ninhydrine/Ethanol : 500 mg de ninhydrine dans 10 ml d'éthanol absolu.

KCN/Pyridine : KCN 20  $\mu\text{M}$  dans la pyridine.

## 3- MODE OPERATOIRE

Un échantillon de résine est prélevé puis séché à l'étuve (50°C) et 10 mg de résine sèche sont introduits dans le fond d'un tube en verre. Les volumes suivants de réactifs sont ajoutés dans le tube contenant l'échantillon ainsi que dans un tube sans échantillon (témoin blanc).

Phénol/Ethanol :	75 $\mu\text{l}$ .
KCN/Pyridine :	100 $\mu\text{l}$ .
Ninhydrine :	75 $\mu\text{l}$ .

Les tubes sont alors incubés dans un bain sec thermostaté à 100°C pendant 7 min, puis 4,75 ml d'éthanol à 60% (en volume) dans l'eau sont immédiatement ajoutés aux tubes afin d'obtenir un volume final de 5 ml. Ces tubes sont enfin agités doucement afin de ne pas plaquer de résine sur les parois. L'absorbance des solutions obtenues est mesurée à 570 nm; le zéro étant réalisé sur de l'éthanol 60% (en volume) dans l'eau . Il faut prendre soin, en remplissant les cuves, de ne pas transférer de résine afin de ne pas altérer la mesure.



#### 4- RESULTATS.

Le nombre de micromoles de fonctions NH<sub>2</sub> par gramme de résine est calculé comme suit :

$$\frac{(\text{Abs}_{570 \text{ nm}} \text{ éch.} - \text{Abs}_{570 \text{ nm}} \text{ blc.}) \times \text{Fd (ml)} \times 10^6}{\epsilon_{570 \text{ nm}} \times \text{M (mg)}}$$

Notes : Fd : facteur de dilution (5 ml).

$\epsilon_{705 \text{ nm}} = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

M : masse de résine en mg

On peut également déduire le pourcentage de couplage :

$$\left[ 1 - \left( \frac{[\text{Amine}] (\mu\text{mole/g})}{\text{substi. init.} (\mu\text{mole/g})} \right) \right] \times 100$$

#### 4- REFERENCES.

Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., and Cook P.I., (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal. Biochem., 34, 595-598.

Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., and Merrifield R.B., (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. Anal. Biochem., 117, 147-157.

**FORMATION DES LIPOSOMES ET  
PREPARATION DES HDL RECONSTITUEES**

**1- LIPOSOMES MULTILAMELLAIRES (MLV)**

Les phospholipides sont mis en solution dans du chloroforme. Ce solvant est ensuite évaporé sous un flux d'azote afin de former un film lipidique sur les parois du récipient. Ce film est séché sous vide pendant 2 heures. Un tampon tris/HCl pH 8,4 est ensuite ajouté et le mélange est chauffé au dessus de la température de transition des phospholipides et agité vigoureusement au vortex. On obtient ainsi des liposomes multilamellaires (MLV).

**2- PETITS LIPOSOMES UNILAMELLAIRES (SUV)**

Les liposomes unilamellaires peuvent être obtenus par 2 méthodes distinctes :

- Par utilisation d'ultra-sons
- Par utilisation d'un détergent

**2.1- Sonication**

La production de petites vesicules unilamellaires (SUV) est assurée par sonication de MLV suivant une variante de la technique décrite par Huang (1969). Cette sonication est réalisée dans les conditions suivantes : 3 séries de 7 min à une puissance de 32 W avec un temps de repos de 2 min entre chaque série. La régulation de la température est assurée par un bain-marie thermostaté à 22°C et l'oxydation des phospholipides contrôlée par un flux d'azote à la surface du milieu réactionnel. Le mélange est ensuite déposé sur une colonne de gel filtration sepharose CL 4B donnant un premier pic contenant les MLV qui sont éliminées, et un second pic contenant les SUV. Ce dernier est récupéré et dosé grâce à un kit enzymatique commercial (Biomerieux, France).

**2.2- Détergent**

La deuxième technique utilisée pour l'obtention des petites vesicules unilamellaires de DPPC fait intervenir un détergent, le cholate de sodium (sel de sodium du 3a,7a,12a-trihydroxy-5b-cholan-24-oïc acide). La suspension de MLV est solubilisée dans du cholate de sodium (6,5 mg/ml) et le mélange est incubé à la température de transition des phospholipides pendant 2 heures selon un rapport cholate/phospholipide en masse de 1,7.

**3- Préparation des HDL reconstituées**

Les complexes lipoprotéiques contenant les lipides (phospholipide SUV ou mélange phospholipide SUV/cholestérol) et les molécules amphipathiques (apolipoprotéines ou peptides) ont été préparés par interaction spontanée de mélanges à la température de transition du phospholipide utilisé. Le temps d'incubation nécessaire est variable suivant la molécule

amphipathique utilisée (apoA-I : 2 heures). Dans le cas de SUV préparées avec du cholate, on réalise l'incubation en présence du détergent, l'élimination du cholate n'intervenant qu'après la formation des complexes. Cette élimination peut être réalisée par dialyse à la température de transition (Matz et Jonas, 1982). Une variante décrite par Bonomo et Swaney (1988) permet la séparation rapide du cholate de sodium par chromatographie d'adsorption sur Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) sur micro-colonne Quick-sep (Isolab). Le rendement d'élimination du cholate de sodium par cette méthode est supérieur à 99,7%. L'isolement des particules reconstituées est ensuite possible par chromatographie de gel filtration sur Superose 6PG (pharmacia, Upsala, Suède) à température ambiante.

#### 4- REFERENCES

Huang C., (1969). Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8, 344-351.

Matz C.E., and Jonas A., (1982). Reaction of human lecithin cholesterol acyltransferase with synthetic micellar complexes of apolipoprotein A-I, phosphatidylcholine, and cholesterol. *J.Biol. Chem.*, 257, 4535-4540.

Bonomo E.A., and Swaney J.B., (1988). A rapid method for the synthesis of protein/lipid complexes using adsorption chromatography. *J. Lipid Res.*, 29, 380-384.

**MARQUAGE A L'<sup>125</sup>I : METHODE DE L'IODOGENE****1- GENERALITES**

Le marquage à l'iode de protéines ou d'anticorps est une technique couramment utilisée en biochimie et, bien que d'autres isotopes soient disponibles, l'iode-125 (<sup>125</sup>I) est employé pour de nombreuses analyses immunochimiques. L'<sup>125</sup>I émet des rayons gamma de faible énergie et des rayons X. Il s'agit donc d'un épitope facile à détecter. Sa demi-vie de 60 jours constitue un bon compromis permettant à la fois le stockage et l'élimination des déchets. Enfin, le coût de l'<sup>125</sup>I est relativement peu élevé.

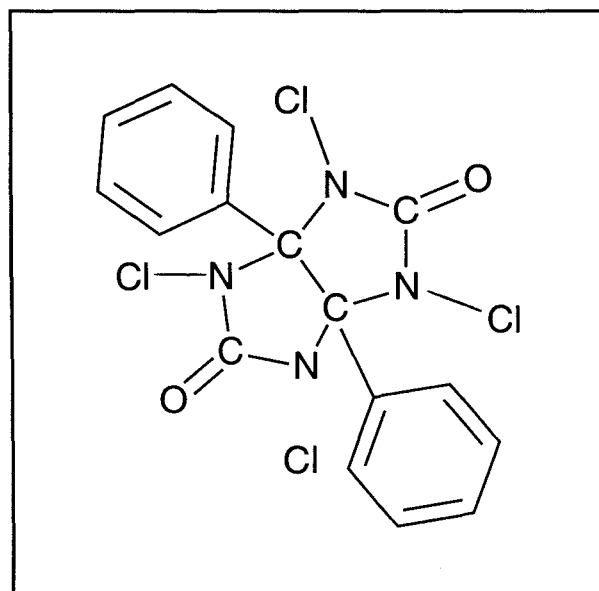
Le problème majeur causé par l'iode-125 est le risque biologique. Toute utilisation d'<sup>125</sup>I doit être protégée, d'une part, d'un possible contact physique avec l'iode, liquide et volatil et, d'autre part, d'une irradiation gamma. Le marquage s'effectue, donc, sous une hotte ventilée fermée et avec des gants. Lorsque le marquage est terminé, le principal danger réside dans l'émission des radiations; on s'en protégera par des écrans appropriés (plomb) et par un système convenable d'élimination des déchets.

**2- PRINCIPE**

Parmi les différentes approches utilisées pour marquer des protéines à l'iode, plusieurs techniques font appel à une oxydation chimique de l'iodure-125 (le plus souvent sous forme de sodium NaI) en <sup>125</sup>I<sup>+</sup> qui attaque les chaînes latérales de la tyrosine et de l'histidine. Dans la méthode décrite ici, l'agent oxydant utilisé est l'iodogène (1,3,4,6-tétrachloro-3a, 6a-diphénylglycoluril, PIERCE Chemical Company). Cette technique présente l'avantage d'être simple et de donner des activités spécifiques élevées. Cependant, elle donne naissance à de l'iode libre (I<sub>2</sub>), la protéine peut être dénaturée par l'oxydation et il y a un risque de marquage trop élevé.

**IODOGENE**

(1,3,4,6-tétrachloro-3a, 6a-diphénylglycoluril)



## 2- MODE OPERATOIRE

### 2.1- Preparations des reactifs

#### *Iodogène.*

Préparer une solution 1 mg d'iodogène par ml de dichlorométhane ou de chloroforme puis répartir 200 µl (200 µg) de solution dans des tubes en verre et laisser évaporer sous hotte à l'obscurité. Les tubes sont ensuite stockés à l'abri de la lumière dans un dessiccateur.

#### *Solution de KI.*

Préparer une solution mère à 0,8 M soit 13,8 g dans 100 ml d'eau pour préparation injectable (EPPI).

#### *Tampon phosphate.*

11,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2,4 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sont dissous dans 1 litre d' EPPI.

### 2.2- MARQUAGE

#### *Sous hotte ventilée.*

Mettre dans un tube apyrogène :

- 200 µg de la protéine à marquer à 1mg/ml.
- 10 µl de solution de KI 0,8 M diluée extemporanément au 1/100.
- 0,5 mCi d'<sup>125</sup>I
- QSP 600 µl de tampon phosphate.

Agiter puis transvaser le mélange dans un tube contenant l'iodogène et agiter vigoureusement pendant 20 minutes.

### 3- CONTROLE DE L'EFFICACITE DU MARQUAGE.

Le contrôle est réalisé par chromatographie de couche mince en déposant 1 µl de solution chaude sur du papier whatman 3M (sécher le dépôt au sèche-cheveux) et faire migrer dans de l'acide trichloroacétique (TCA) 10%. Après migration, le papier est séché puis découpé en bandelettes de 1 cm de largeur. Ces bandelettes sont introduites dans des tubes dans l'ordre de découpage et la radioactivité est mesurée au compteur gamma.

Le TCA 10% précipite les protéines qui restent au point de dépôt alors que l'iode libre, qui n'est pas précipité, peut migrer avec le front de migration. On est donc en mesure, avec cette technique, de séparer et quantifier l'iode libre et l'iode fixé sur la protéine.

En règle générale, cette technique donne lieu à des rendements de l'ordre de 95 % de marquage. Si toutefois la quantité d'iode libre résiduelle était trop importante, il est possible d'en éliminer une partie en ajoutant à la solution de protéine marquée un peu de résine Dowex (Biorad AG 2x8 100-200 mesh) qui capte l'iode libre. La résine complexée à l'iode est ensuite, éliminée par centrifugation (4 min à 5000 tr/min). Pour plus de précaution, la protéine est enfin dialysée contre du tampon PBS 0,1 M pH 7,2 à 4°C, jusqu'à élimination totale de l'iode libre.

### 4- REFERENCE.

Fraker P.J., and Speck J.C. Jr., (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-Tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun.,80, 849-857.

<b>MILIEUX DE CULTURES</b>
----------------------------

**1- GENERALITES**

Cette fiche technique présente les protocoles de préparation d'un certain nombre de tampons et milieux utilisés pour la culture des cellules FU5AH et HeLa. Ces solutions sont systématiquement stérilisées avant usage par passage sur un filtre 0,22 µm.

**2- TAMPONS****2.1- PBS 0,01M - NaCl 0,15 M (PBS Cellulaire)**

Le Tampon PBS est utilisé pour rincer les cellules ou pour dissoudre les agents pharmacologiques.

NaCl	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	2,87 g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
KCl	0,2 g
Eau déminéralisée QSP	1 litre
pH, HCl 0,1 M	7,2-7,4

**2.2- EDTA - NaCl 0,15 M**

NaCl	8 g
Hydrogencarbonate de sodium	0,3 g
EDTA	0,2 g
KCl	0,4 g
Eau déminéralisée QSP	1 litre
pH pH, HCl 0,1 M	7,2-7,4

**3- MILIEUX DE CULTURES****3.1- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**

DMEM	66,6 g
Pénicilline 10000 U/ml et Streptomycine 1 mg/ml	10 ml
Bicarbonate de sodium 5,6%	180 ml
Eau déminéralisée QSP	5 litres
pH pH, HCl 0,1 M	7,2-7,4

### 3.2- Minimum Essential Medium (MEM)

MEM	47,6 g
Péniciline 10000 U/ml et Streptomycine 1 mg/ml	1 ml
Hydrogencarbonate de sodium	11 g
Eau déminéralisée QSP	1 litre
pH pH, HCl 0,1 M	7,4

## ETUDE DE LA FIXATION DE HDL RECONSTITUEES SUR CELLULES

### 1- PRINCIPE

On cherche, par ce type d'expérience, à estimer la capacité d'un ligand à se fixer spécifiquement sur la membrane d'une cellule. Les plaques multi-puits où sont cultivées les cellules, sont mises en contact avec des ligands marqués et sont incubés à 4°C. L'incubation à basse température permet de mesurer la fixation seule et non la résultante d'un phénomène dynamique plus complexe : fixation + internalisation.

La courbe de fixation obtenue est linéarisée par "Scatchard" et un nombre de sites de fixation du ligand ainsi qu'une constante d'association en sont déduits.

### 2- MODE OPERATOIRE

#### 2.1- Marquage

Les HDL reconstituées sont marquées à l'<sup>125</sup>I par la méthode à l'iodogène. Cette technique permet de marquer les protéines, principalement par leurs résidus tyrosine. Cependant, il faut considérer qu'environ 5% de la radioactivité est associée aux lipides.

#### 2.2- Binding

Les cellules sont conditionnées dans des boîtes 6 puits (35 mm de diamètre) et amenées à confluence. Le milieu de culture est alors aspiré et la culture est lavée par du milieu frais. Les cellules sont ensuite mises en contact pendant 2 heures à 4°C avec les ligands marqués en solution dans le DMEM.

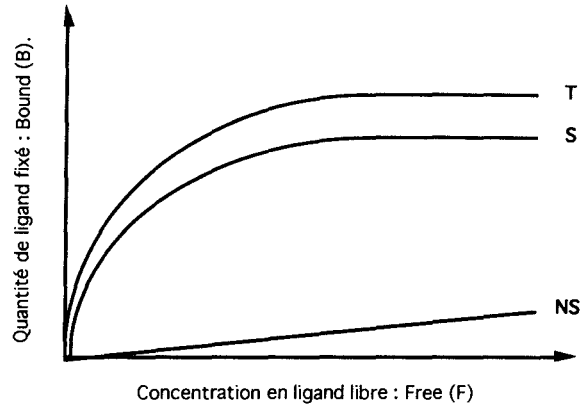
Chaque point, correspondant à des concentrations croissantes en ligand, est réalisé en triple exemplaire. Cet ensemble de points permet de déterminer la fixation totale (spécifique + non spécifique). 2 points supplémentaires sont réalisés en présence d'un excès de ligand non marqué (20 à 80 fois) afin d'estimer la fixation non spécifique de chaque ligand.

Après cette incubation, les cellules sont lavées par du DMEM pour éliminer les ligands non fixés et sont ensuite décollées du support plastique par de la soude 0,1 M. La radioactivité présente dans chaque puits peut ainsi être mesurée au compteur gamma. La concentration en protéine cellulaire est mesurée par dosage de Petersen.

### 3- RESULTATS

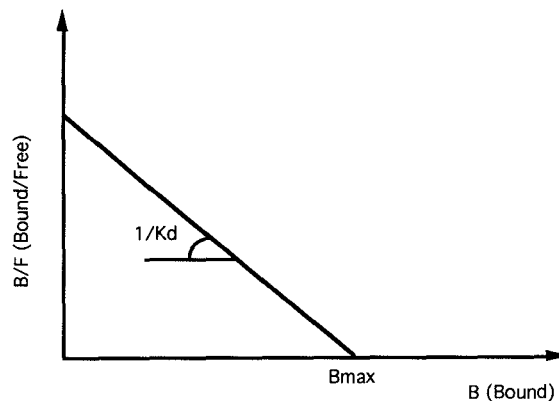
Les courbes de fixation totale et non spécifique sont tracées en portant en abscisse, la concentration en ligand dans le milieu d'incubation que l'on assimile à la concentration de ligand non fixé ( $\mu\text{M}$ ) et en ordonnée, la quantité (en pmoles) de ligand fixé par mg de protéine cellulaire. La courbe de fixation spécifique (S) est obtenue en faisant la différence points par points entre la fixation totale (T) et la fixation non spécifique (NS).





### Courbes types de fixation cellulaire d'un ligand spécifique.

La courbe de fixation spécifique (S) peut, ensuite, être linéarisée pour déterminer les paramètres de fixation du ligand sur la cellule étudiée. Parmi les nombreuses méthodes disponibles, c'est le diagramme de Scatchard qui est la plus utilisée. Elle consiste à représenter en abscisse, F : la concentration en ligand libre et en ordonnée, B/F : le rapport ligand fixé sur ligand libre. Cette représentation permet d'obtenir la quantité maximale de ligands fixé à saturation des sites ( $B_{max}$  en ng/mg de prot. Cell.) et de calculer la constante de dissociation du ligand pour le site de fixation cellulaire ( $K_d$ ).



### Diagramme de SCATCHARD.

#### 4- REFERENCES

Luchoomun J., Theret N., Clavey V., Duchateau P., Rosseneu M., Brasseur R., Deneffe P., Fruchart J.C., and Castro G. (1993). Structural domain of apolipoprotein A-I involved in its interaction with cells. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1212, 319-326.

Petersen G.L., (1977). A simplification of the protein assay method of lowry which is more generally applied. *Anal. Biochem.*, 83, 346-356.

Scatchard G. (1949). The attraction of proteins to small molecules and ions. *N. Y. Acad. Sci.*, 51, 660-672.

## CULTURE DES CELLULES FU5AH ET EFFLUX DE CHOLESTEROL

### 1- GENERALITES

Les cellules FU5AH sont des cellules extraites d'un hépatôme de rat. Ces cellules ont été choisies pour leur capacité à relarguer rapidement le cholestérol de leur membrane plasmique. Bien que ce modèle cellulaire soit d'origine hépatique et non périphérique, les cellules FU5AH semblent s'imposer aux yeux de nombreuses équipes de recherche comme un modèle de choix pour l'étude de l'efflux de cholestérol. Cette lignée cellulaire présente, en effet, de nombreux avantages :

- sa culture est facile, sa croissance rapide.
- elle a fait l'objet de nombreuses études donnant des données extrêmement reproductibles en matière de métabolisme cellulaire du cholestérol.
- elle ne sécrète pas de lipoprotéines, de LCAT ou d'acides biliaires en quantité significative, en dépit de son origine hépatique tout en conservant la capacité de fixer spécifiquement les HDL et les lipoprotéines contenant de l'apo B.
- Cette lignée cellulaire est celle qui, à ce jour, a montré la plus grande capacité à donner des efflux de cholestérol importants et rapides.

### 2- MODE OPERATOIRE

#### 2.1- Culture

Les cellules FU5AH sont cultivées à 37°C en milieu MEM supplémenté par 5% de sérum de veau, 2 mM de Glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. L'entretien des cellules s'effectue dans des flacons présentant une surface cultivable de 80 cm<sup>2</sup>. Environ 10<sup>6</sup> cellules sontensemencées dans 7 ml de milieu complet. Dans ces conditions et avec 2 réapprovisionnement en milieu frais, les cellules arrivent à confluences en 5 à 6 jours.

#### 2.2- Préparation de l'efflux

Pour l'étude de l'efflux de cholestérol, les cellules sontensemencées dans des boîtes à 6 puits (35 mm de diamètre) à raison de 8 x 10<sup>4</sup> cellules par puits en présence de milieu MEM supplémenté par 5% de sérum de veau. Elles sont mises en culture pendant 2 jours à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Puis, du cholestérol tritié [1,2-H<sup>3</sup>] est ajouté à du sérum de veau mis en solution à 25% dans le MEM. Cette solution est ensuite rediluée à 5% dans le MEM et utilisée pour obtenir 1 µCi par puits. Les cellules sont cultivées 2 jours de plus dans ces conditions jusqu'à confluence. Pendant cette période, le cholestérol marqué s'échange et investit tous les *pools* cellulaires de cholestérol. Afin d'équilibrer ces *pools* de cholestérol marqué, les cellules sont laissées en contact avec du milieu MEM additionné de 0,5% de SAB pendant 24 heures. Les cellules sont alors prêtes à être utilisées pour une expérience d'efflux de cholestérol.

### 2.3- Efflux

Les cellules subissent un premier lavage au PBS cellulaire et sont incubées à 37°C en présence d'un ml de particules à tester dont la concentration en phospholipides est ajustée à 100 µg/ml. Après des temps d'incubation de 0, 2 et 4 heures, l'efflux est stoppé en plaçant les cellules à 0°C. Le milieu est récupéré par aspiration et sa radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur bêta. D'autre part, les cellules sont lavées par du tampon PBS cellulaire puis décollées du support plastique par 0,1 ml de NaOH 0,1 M. Le comptage de la radioactivité des cellules est effectué sur 0,5 ml de la suspension ainsi obtenue.

### 3- RESULTATS

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'efflux à 2 heures et à 4 heures, soit :

$$\frac{\text{Radioactivité du milieu} \times 100}{(\text{Radioactivité du milieu} + \text{Radioactivité des cellules})}$$

### 4- REFERENCES

Reuber M.D. (1961). A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 26, 891-897.

De la Llera Moya, M., Atger V., Paul J.L., Fournier N., Moatti N., Giral P., Friday K.E., and Rothblat G. (1994). A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb.*, 14, 1056-1065.

## PURIFICATION ET MESURE DE L'ACTIVATION DE LA LCAT

### 1- PURIFICATION DE LA LCAT

La densité d'un sérum humain est ajustée à 1,21 mg/ml. Le serum est ensuite centrifugé à 55000 RPM pendant 30 heures. La fraction de densité 1,21-1,25 g/ml contenant l'essentiel de la LCAT est dialysée contre un tampon tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl pH 7,6. La séparation de l'enzyme est assurée par un passage sur colonne Affi-Gel Blue puis sur DEAE 52. Après lavage de cette dernière colonne par un tampon tris-HCl, 5mM EDTA, 74 mM NaCl pH 7,6, la colonne est éluée à l'aide d'un gradient en NaCl allant de 75 à 200 mM et les fractions contenant l'activité enzymatique sont collectées et dialysées contre un tampon phosphate de sodium 5 mM, 140 mM NaCl pH 7,6. L'ultime étape de purification fait intervenir 2 passages successifs sur une colonne d'hydroxyapatite équilibrée avec le tampon précédent. L'éluion est réalisée à l'aide d'un gradient compris entre 10 et 60 mM en phosphate de sodium. L'enzyme purifiée est ensuite dialysée contre un tampon tris/HCl 10 mM, EDTA 5 mM pH 7,6 et stérilisée par passage sur un filtre 0,22 µm.

### 2- ACTIVATION DE LA LCAT

#### 2.1-Incubation du substrat avec l'enzyme

On utilise des HDL reconstituées et purifiées contenant du cholestérol qui constitue le substrat. On cherche à déterminer la capacité de la composante protéique des complexes à activer la réaction cholestérol ----> ester de cholestérol catalysée par la LCAT. Pour cela un réacteur est préparé comme suit :

- Substrat (cholestérol) à 20 mM.
- Enzyme (LCAT).
- Activateur de la LCAT (β-mercaptoethanol) 100 mM.
- BSA 120 mM (élimination de la lysolecithine formée).
- Tampon 5 mM Tris-HCl pH 8,1 QSP 25 ml.

L'incubation est réalisée à 37°C et des prélèvements (dont un T<sub>0</sub>) sont effectués régulièrement. La réaction dans les échantillons est arrêtée par refroidissement dans la glace fondante et ajout d'un mélange hexane/isopropanol (3/1 en volume) qui sépare l'enzyme de son substrat lipophile. Le mélange hexane/isopropanol va permettre en outre l'extraction du cholestérol estérifié. Avant cette extraction, on ajoute dans chaque tube un standard interne de cholestérol estérifié : 50 µl de cholestérol heptadecanoate 17:0 à 50 mg/ml. Pour l'extraction, les échantillons sont centrifugés à 3000 RPM, pendant 10 min puis la phase aqueuse est éliminée, tandis que la phase organique est séchée et rincée 3 fois par du chloroforme.

## 2.2- Dosage du cholestérol par hplc

Le mélange est resuspendu dans 50  $\mu$ l d'une solution chloroforme/acétonirile (1/1 en volume). Le cholestérol estérifié est ensuite dosé par RP-HPLC sur une colonne Zorbax-ODS (250 x 4,6 mm). Le débit utilisé est 1,2 ml par min et les esters de cholestérol sont détectés en U.V. à 210 nm. La quantification est réalisée à l'aide d'un standard externe de cholestérol esterifié.

## 2.2- Résultats

Après quantification du cholestérol esterifié dans les prélèvements, on peut tracer le pourcentage de cholestérol estérifié en fonction du temps et calculer la vitesse initiale  $V_0$  (nmol CE/5  $\mu$ l LCAT/heure) d'estérification du cholestérol pour la particule reconstituée.

## 3- REFERENCE.

Matz C.E. and Jonas A., (1982). Reaction of human lecithin cholesterol acyltransferase with synthetic micellar complexes of apolipoprotein A-I, phosphatidylcholine and cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 257, 8, 4541-4546.

## Résumé

Le taux plasmatique d'apolipoprotéine A-I (apoA-I), constituant protéique majeur des HDL, présente une forte corrélation négative avec le risque de maladies coronariennes. Le mécanisme qui confère à cette apolipoprotéine son caractère anti-athérogène est encore mal connu, mais l'hypothèse la plus répandue est qu'elle interviendrait à différents stades du processus métabolique d'épuration du cholestérol des cellules périphériques : le transport inverse du cholestérol. De récentes études, basées sur des techniques immuno-chimiques, suggèrent que la région 145-183 de l'apoA-I pourrait être étroitement impliquée dans certaines étapes liées à ce processus.

La synthèse peptidique constitue un outil de choix pour l'étude des domaines fonctionnels des protéines. Dans le cas de segments courts d'apolipoprotéine, une telle étude n'a de sens que si elle peut être réalisée dans l'environnement physico-chimique de la protéine dans le plasma, c'est-à-dire en association à des lipides au sein des HDL. Une première approche utilisant la séquence 145-183 de l'apoA-I humaine a permis de fixer les limites étroites d'un modèle peptidique linéaire. Nous avons montré qu'en revanche, il est possible de mimer les propriétés physico-chimiques de l'apoA-I native au sein des HDL grâce à des constructions peptidiques dendrimériques. Ces peptides branchés, constitués de l'association parallèle sur une matrice de lysines de plusieurs copies du segment 145-183 de l'apoA-I, permettent de satisfaire à chacune des deux conditions suivantes : l'utilisation d'un seul type d'unité structurale spécifique afin de définir sa fonction exacte dans la protéine et la nécessité d'associer plusieurs unités structurales entre elles pour permettre la production de particules stables et homogènes en présence de lipides. Une optimisation du modèle a permis de mettre en évidence qu'une construction constituée de trois copies de l'unité structurale 145-183, le trimère apoA-I [145-183], est la plus apte à mimer les propriétés physico-chimiques de l'apoA-I native au sein des HDL.

Les propriétés biologiques de notre modèle dendrimérique synthétique ont également été étudiées et comparées à celles de l'apoA-I humaine. L'activation de la lécithine cholestérol acyl transférase ne semble pas faire partie des propriétés mimétiques de ce modèle synthétique. En revanche, comme l'apoA-I native, les constructions dendrimériques sont capables de se fixer de façon spécifique sur les membranes des cellules HeLa, suggérant ainsi que la séquence 145-183 est étroitement impliquée dans cette interaction. Les particules reconstituées avec les peptides dendrimériques apoA-I [145-183] sont, par ailleurs, capables d'induire un efflux du cholestérol d'adipocytes (OB117) ou d'hépatômes (FU5AH) comparable à celui induit par l'apoA-I native.

Les constructions dendrimériques, mises au point dans cette étude, pourraient constituer une alternative intéressante à l'utilisation, d'une part, des peptides linéaires qui présentent de faibles propriétés mimétiques des apolipoprotéines échangeables et, d'autre part, des mutants d'apolipoprotéines dont la production est souvent délicate et qui ne procurent qu'une information globale par rapport à la séquence. En outre, puisque les segments hélicoïdaux des autres apolipoprotéines échangeables présentent des homologies structurales importantes avec le segment décrit dans cette étude, il apparaît raisonnable d'envisager l'utilisation de ce modèle synthétique pour l'étude des relations structure-fonctions d'autres apolipoprotéines comme l'apoA-IV, l'apoE, l'apoA-II, ou l'apo C.

Une autre partie de notre travail a consisté à évaluer l'importance de la présence d'une séquence spécifique de l'apoA-I dans nos constructions pour mimer les propriétés physico-chimiques, et éventuellement physiologiques, de cette apolipoprotéine. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie combinatoire convergente. Ceci nous a permis de préparer, en une seule synthèse, une famille de peptides, Deg<sub>1</sub> (apoA-I 145-183), possédant des séquences primaires différentes mais toutes apparentées. Cette étude préliminaire montre que la dégénérescence naturelle de la séquence 145-183 de l'apoA-I est sans doute trop importante et ne permet pas de retrouver toutes les propriétés attendues. Tout semble se passer comme si une partie seulement des membres de cette famille possédait une structure homogène, apte à mimer certaines propriétés de l'apoA-I. Dans la conclusion de cette étude, nous proposons l'utilisation d'une autre famille, Deg<sub>2</sub> (A-I 145-183), choisie selon des critères plus stricts et qui devrait permettre, à court terme, de répondre aux objectifs fixés.