



HAL
open science

Perméabilisation photocontrôlée de la membrane biologique : étude en systèmes modèles et en cellules

Dimitra Milioni

► **To cite this version:**

Dimitra Milioni. Perméabilisation photocontrôlée de la membrane biologique : étude en systèmes modèles et en cellules. Biophysique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66528 . tel-00833272

HAL Id: tel-00833272

<https://theses.hal.science/tel-00833272>

Submitted on 12 Jun 2013

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Biophysique
Ecole doctorale Interdisciplinaire pour le vivant

Présentée par

Dimitra Milioni

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Perméabilisation photocontrôlée de la membrane biologique :
étude en systèmes modèles et en cellules**

soutenue le 26 novembre 2012

devant le jury composé de :

M. Loïc Auvray
Mme Sophie Cribier
Mme Cécile Huin
M. Frédéric Pincet
Mme Sandrine Sagan
M. Justin Teissié
Mme Véronique Vié

Examineur
Directrice de thèse
Examinatrice
Examineur
Invitée
Rapporteur
Rapporteuse

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Biophysique
Ecole doctorale Interdisciplinaire pour le vivant

Présentée par

Dimitra Milioni

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Perméabilisation photocontrôlée de la membrane biologique :
étude en systèmes modèles et en cellules**

soutenue le 26 novembre 2012

devant le jury composé de :

M. Loïc Auvray
Mme Sophie Cribier
Mme Cécile Huin
M. Frédéric Pincet
Mme Sandrine Sagan
M. Justin Teissié
Mme Véronique Vié

Examinateur
Directrice de thèse
Examinatrice
Examinateur
Invitée
Rapporteur
Rapporteuse

Remerciements

En arrivant à la fin, il est vrai qu'on a envie de tout commencer dès le début, mais bon...c'est la fin, il est temps d'écrire les remerciements...

Je voudrais tout d'abord et très sincèrement remercier le **Dr. Justin TEISSIÉ** et la **Dr. Véronique VIÉ** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci pour le temps, les conseils et l'énergie que vous avez décidé d'y dédier.

Je tiens aussi à remercier le **Dr. Loïc AUVRAY** et la **Dr. Cécile HUIN** d'avoir accepté d'être examinateurs à mon jury de thèse, mais surtout de m'avoir « fait connaissance » avec les BLM et l'électrophysiologie ! Et un merci de plus à **Cécile** de m'avoir appris que les BLM ne sont pas toujours sympathiques...mais que quand ils le sont, ils sont superbes !

Je remercie aussi **Dr. Frédéric PINCET** d'avoir accepté d'être dans mon jury, ainsi que d'avoir été mon tuteur pendant ces trois ans (et de m'avoir envoyé des lettres de recommandation même quand je les demandais pendant les vacances... !).

Je remercie également **Dr. Christophe Tribet** de m'avoir confié « son » 15C8 10azo et **Dr. Sarra Sebai** de m'avoir donné les petits astuces sur le polymère et de m'avoir conseillé à différents moments !

Ces travaux de thèse ont été (majoritairement) réalisés au Laboratoire des BioMolécules UMR 7203. Merci à la **Pr. Solange LAVIELLE** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Merci à **Eliane**, à **Nathalie** et à **Stéphane**.

Et venons au campus Jussieu : Merci à touououououous les gens de tououououtes les équipes du 7^e étage !!! Mais parmi eux, un merci spécial va aux membres de l'équipe 2 :

Merci **Sophie** !!! De m'avoir introduit au monde de l'interdisciplinarité, des vésicules et des lipides, de m'avoir appris de tout mettre en cause pour améliorer la qualité des manips, d'avoir supporté mes « mauvaises » périodes, de m'avoir fait confiance pour enseigner ! Et bien sûr, d'avoir essayé (et la plupart de fois réussi !) de comprendre ce que je voulais dire derrière les phrases « construites à l'inverse » en français, de m'avoir appris la différence entre « amener » et « apporter » (pourtant, j'ai toujours du mal avec « de » et « des » ☺). Bref, merci !!!!!

Un grand merci à **Sandrine** pour l'organisation de l'équipe, encore plus pour son humeur, mais surtout de m'avoir fait connaissance avec le monde des cellules, d'ITC, de DMEM, de HBSS, de PBS et tous les autres mots qu'il y a peu de temps, me paraissaient incompréhensibles !

Merci à mon « grand-père » **Nicolas** pour les conseils et les conversations sur la science, mais aussi pour ses conseils gourmandes et des informations sur la qualité des desserts de la

cantine ! Merci à **Claire** pour son humeur exceptionnel et pour ses connaissances sur les peptides antimicrobiens, merci à **Dominique** pour sa gentillesse et ses conseils, merci à tous les trois pour les apéros et le thé dans votre bureau (même si je n'aime pas le thé moi !).

Merci à **Karine** avec qui je n'ai pas eu encore le temps de me connaître, merci à **Thierry**, merci à **Jésus**.

Merci au pire (et en même temps le mieux) bureau de l'étage ! A **Fabienne** pour son humeur, ses conseils, nos discussions et de m'avoir expliqué des choses « bizarres » de Chimie, sa compagnie cloppe (même si maintenant normalement C'EST FINI pour elle !) et du nouveau appareil à filtrer l'eau ! Merci à **Françoise** pour ses blagues, sa gestion de « Château d'eau » (et oui, ça le mérite bien ça !) et sa compagnie ! Merci à **Manjula** !

Merci à « la masse » : à **Manu** pour nos discussions, nos échanges, le courage qu'elle m'a envoyé par mail pendant ma période de rédaction, les invitations chez elle (et je tiens à préciser qu'elle sait bien choisir des robes :p). Vraiment, un très bon souvenir ! Merci à **Gérard** pour toutes les discussions et de ses questions sur « la situation en Grèce » ! Et oui Gérard, ça va de pire en pire – mais moi je veux bien y rentrer !

Et maintenant les thésards de l'équipe :

Merci aux « jeunes » (...fin...qui maintenant ne le sont plus !) à **Tom** (et son côté ironique !) et à **Sévérine** ! Merci d'avoir été si compréhensibles de mes (non) disponibilités pendant cette dernière période ! Et **Pierre**, j'espère que ça se passe super ! Bon courage à tous les trois !

Un ééééééééééééééééééééééééééééééénorme merci aux « vieilles » : par ordre alphabétique, **Dr. Chérine Bechara**, **Dr. Lucrece Mathéron** et **Dr. Astrid Walrant** (hmmmmm, il est temps que je finisse moi aussi là j'ai l'impression, comment aurai – je le droit de vous fréquenter ?). Merci **Chérine** de tout, tout, tout, tout, tout !!!! Les blagues, les pauses cloppes, les verres, le porto dans le bureau à 22h, des mots super – utiles que je connais en libanais, le courage pendant la période de rédaction, mais aussi avant. D'avoir regardé avec moi mes manips d'ITC en plein mois d'août, de m'avoir montré comment on se débarrasse des cellules (:p) et de nous avoir montré le danse libanais pendant une crise de rédaction pour moi et de préparation du powerpoint pour toi. Merci à **Lucrece** pour les discussions, les sushi (j'ai oublié comment faire...il faut que tu nous remontes !), les informations sur l'escalade (« David dit que... »), sur « ce que ça veut dire » chaque mot de chaque phrase que tu pensais que je n'avais pas compris (même si pourtant j'avais déjà compris !). Merci à **Astridddd** !!!! De ses questions sur le grec ancien, de ses recherches wikipédia, de ses explications scientifiques, d'avoir géré « Château d'eau » avant Françoise, de m'avoir soutenu quand je voulais la pizza à la cantine, d'avoir été agréable en tout moment, de m'avoir sorti de nulle part sa seule phrase en grec moderne (qui, avouons, est n'importe quoi !!!), de ses explications et ses connaissances. C'était super d'avoir passé avec vous tout ce temps !!!

Une partie de ces travaux de thèse a été réalisée au Laboratoire de Biologie Physico – Chimique des protéines membranaires (UMR 7099). Je tiens à remercier très sincèrement

tous les membres de l'équipe, mais un peu (voire beaucoup même !) plus **Edith, Dror et Laurent** d'avoir été là, d'avoir fait partie de mon intégration et de m'avoir montré « Soul train » !!!

Les expériences sur les BLM ont été faites à l'Université d'Evry (Sophie, je ne trouve pas le caractère majuscule « é » avec l'accent !), à l'UMR 8587. Je remercie tous les membres de l'équipe, un peu plus les gens de la pièce « BLM » et encore plus **Jérôme** pour tout le support au niveau de dispositif, de Igor, des macros, des questions,... **Cécile**, je te remercie une deuxième fois encore pour tout, j'ai le droit, n'est-ce pas ? ☺

Merci aux enseignants et aux étudiants de la promo du Master 2 de Biophysique ! Merci à **Tom**, à **Hiba**, à **Marc**. Merci à **Fred** (qui j'avais croisé le soir même du premier jour du Master Chez Gladines !), à **Aouefa** (de tout et d'avoir été la raison pour laquelle j'ai connu Berlin), à **Pierre** (de m'avoir appris et entraîné au verlan – tu m'as pourtant pas appris comment écrire le mot, je l'ai donc peut – être massacré là) et bien sûr à **Alice** pour tout : de me parler à chaque fois à la vitesse correspondante à mon niveau de français (et je sais qu'au début c'était pas évident de se faire comprendre, ni à me comprendre à moi !!!), de m'avoir appris différents groupes de mots : ceux qu' « il faut pas dire à Sophie » , ceux que « tu peux dire à Sophie, mais c'est familier » et les mots simplement « normaux ».

Merci à mes ami(e)s ! Anciens et plus récents, en France et en Grèce (et un peu partout dans le monde...) !!! Un merci spécial à **Αγγελική** qui a été présente pendant la dernière semaine de rédaction qui n'a pas été du tout facile pour des raisons qui n'ont rien à voir avec la thèse. Une pensée de plus à ceux et celles qui sont toujours en Grèce et qui continuent à se battre...

Un grand, grand merci à **mes parents** pour tout ce qu'ils ont fait pour moi ! Merci à **Μαριάννα** et à **Χάρης** ! D'avoir joué les rôles de sœur et frère et en même temps le rôle des « parents » qui donnent des conseils des « grands » (même si ça m'a toujours énervé et je suis sûre que ça va continuer à le faire !). Merci de m'avoir fait une tante !!! **Νεφέλη** je n'ai pas (encore) de quoi te remercier, mais je veux te mentionner tout de même ! Et **quelqu'un(e) d'autre** qui n'est même pas encore né(e) !

Un merci à ma tante qui a été ma toute première prof de français (et désolée pour tous les petits chocolats que j'avais mangé en caché – enfin, c'est ce que je pensais à l'époque !).

Finalement merci à tous les gens qui m'ont influencé, de mauvaise ou de bonne manière, parce qu'ils ont fait de moi ce que je suis.

Et voilà, j'ai exagéré, ça commence à faire trop, je m'arrête !

(et oui, là vous avez vu mon français sans l'intervention de Sophie – merci encore Sophie !!!)

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	13
Avant - propos.....	15

A. INTRODUCTION

I. LA MEMBRANE BIOLOGIQUE.....1

<i>I.1. LES LIPIDES.....</i>	<i>22</i>
a. La géométrie et les phases des lipides.....	22
b. Les lipides de la membrane plasmique.....	28
<i>Les glycérophospholipides.....</i>	<i>28</i>
<i>Les sphingolipides.....</i>	<i>31</i>
<i>Les stérols (le cholestérol).....</i>	<i>32</i>
c. L'asymétrie lipidique.....	33
<i>I.2. LES MEMBRANES – MODELES.....</i>	<i>34</i>
a. Les Vésicules Géantes Unilamellaires (Giant Unilamellar Vesicles – GU).....	35
b. Les films noirs (Black Lipid Membranes – BLM).....	37
<i>I.3. DEFORMATIONS MEMBRANAIRES.....</i>	<i>38</i>
a. Propriétés mécaniques de la bicouche lipidique.....	39
b. Bourgeonnement membranaire.....	41
<i>I.4. LA DESTABILISATION DE LA BICOUCHE LIPIDIQUE – FACTEUR DE COMMUNICATION AVEC SON ENVIRONNEMENT.....</i>	<i>43</i>
a. La perméabilité de la membrane.....	44
b. La fusion et la fission membranaire.....	47
<i>La fusion.....</i>	<i>47</i>
<i>La fission.....</i>	<i>49</i>

II. LA PERMEABILISATION MEMBRANAIRE.....

<i>II.1. L'IMPORTANCE DE LA PERMEABILISATION MEMBRANAIRE.....</i>	<i>51</i>
a. Différentes approches de perméabilisation membranaire.....	54
<i>Les détergents.....</i>	<i>54</i>
<i>Peptides antimicrobiens.....</i>	<i>54</i>
<i>Électroporation.....</i>	<i>56</i>
<i>Microinjection.....</i>	<i>56</i>

II.2. PERMEABILISATION DE LA MEMBRANE AVEC DES POLYMERES AMPHIPHILES.....	57
a. Les polymères amphiphiles.....	58
b. Polymères modifiés Azobenzene (AMP) : le 15C8 10azo.....	59

B. PARTIE EXPERIMENTALE

III. ÉTUDE DANS DES SYSTEMES MODELES : GUV.....6

III.1. LA MICROSCOPIE.....	65
a. Microscopie à contraste de phase.....	65
b. Microscopie de fluorescence.....	66
III.2. OBSERVATION DES GUV EN MICROSCOPIE.....	69
a. Préparation des <i>pol</i> – GUV.....	69
b. Acquisition des images.....	70
c. Traitement des images.....	72
III.3. RESULTATS (TRANS – AMP).....	74
a. Ajustement de données obtenues.....	74
b. La fuite de différentes sondes et leur cinétique.....	79
III.4. RESULTATS (CIS – AMP).....	80
III.5. DISCUSSION.....	81

IV. ÉTUDE DANS DES SYSTEMES MODELES : BLM.....8

IV.1. ELECTROPHYSIOLOGIE DANS DES BLM.....	85
IV.2. PERMEABILISATION DES BLM A L'AIDE DU 15C8 10AZO.....	90
a. AMP ajouté en conformation <i>trans</i> -AMP.....	90
<i>Bicouches formées en présence du trans – AMP.....</i>	<i>97</i>
b. AMP ajouté en conformation <i>cis</i> -AMP.....	101
c. Le basculement entre <i>cis</i> - AMP et <i>trans</i> – AMP.....	102
<i>Basculement trans vers cis – AMP.....</i>	<i>103</i>
<i>Basculement cis vers trans vers cis – AMP.....</i>	<i>10</i>
d. Discussion.....	107
<i>La diversité des résultats.....</i>	<i>107</i>
<i>Homogénéité des résultats : des données sur les structures de perméation ?.....</i>	<i>108</i>
<i>Durée de vie et fermeture des structures de perméation.....</i>	<i>109</i>
<i>Les fluctuations du courant.....</i>	<i>110</i>

IV. 3. CARACTERISATION DES STRUCTURES DE PERMEATION.....	112
a. Nature des structures de perméation.....	112
b. Taille des pores.....	113
IV. 4. CONCLUSION ET DISCUSSION : SUR LES PAS D'UN MECANISME DE PERMEABILISATION.....	114
V. DANS LE CONTEXTE CELLULAIRE.....	11
V.1. SUIVI DE LA FUITE DU CONTENU INTRA CELLULAIRE.....	119
a. La CFDA.....	119
b. Préparation de l'échantillon.....	120
c. Résultats obtenus.....	121
V.2. INSERTION DES MOLECULES DANS LES CELLULES A L'AIDE DU 15C8 10AZO.....	123
a. Entrée du petit peptide R6L3.....	123
<i>Préparation de l'échantillon.....</i>	<i>125</i>
<i>Résultats obtenus.....</i>	<i>125</i>
b. Étude de l'interaction 15C8 10azo – R6L3.....	128
<i>La calorimétrie de titrage isotherme (Isothermal Titration Calorimetry – ITC).....</i>	<i>128</i>
<i>Interaction trans – AMP et R6L3.....</i>	<i>130</i>
<i>Interaction trans – AMP et [Met9]-SP.....</i>	<i>131</i>
C. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	137
D. MATERIEL ET METHODES	
1. EXPERIENCES SUR DES <i>GUV</i>	143
a. Fabrication des <i>GUV</i> et des <i>pol – GUV</i>	143
b. Observation des <i>GUV</i> sous microscope.....	146
2. EXPERIENCES SUR DES <i>BLM</i>	147
a. Le dispositif utilisé, la fabrication des films noirs et la visualisation des résultats.....	147

3. CULTURE CELLULAIRE ET PROTOCOLES DETAILLES DES EXPERIENCES REALISEES	
<i>AVEC DES CELLULES</i>	149
a. Culture cellulaire des CHO.....	149
b. Test de cytotoxicité.....	149
c. Expérience de fuite de CFDA.....	150
d. Expérience d'internalisation du peptide R6L3.....	150
<i>Préparation de l'échantillon</i>	150
<i>Lavage des billes magnétiques et capture des peptides</i>	152
e. Expérience ITC.....	153

REFERENCES.....	155
-----------------	-----

ANNEXE

1. <i>ELECTROPHYSIOLOGIE EN BLM : DIVERSITE DES RESULTATS OBTENUS</i> (RESULTATS NON MONTRES DANS LE CHAPITRE IV).....	169
➔ Des intensités d'ordre de grandeur inférieur.....	169
➔ Des intensités d'ordre de grandeur supérieur.....	170
2. <i>PHOTOCONTROL OF THE TRANSLOCATION OF MOLECULES, PEPTIDES AND QUANTUM DOTS THROUGH CELL AND LIPID MEMBRANES DOPED WITH AZOBENZENE COPOLYMERS, ANGEW CHEM INT ED ENGL, 2012. 51(9): P. 2132-6</i>	175

Liste des abréviations

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

AMP : Azobenzene Modified Polymer

BLM : Black Lipid Membrane

BSA : Bovine Serum Albumin

CFDA : Carboxy Fluorescein DiAcetate

CHO : Chinese Hamster Overy (Cells)

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

GUV : Giant Unilamellar Vesicles

HMPA : Hydrophobically Modified Poly(acrylic) Acid

ITC : Isothermal Titration Calorimetry

LN : LipoNanosomes

NBD – PC : {6 -[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl} - sn – glycerol - 3 - phosphocholine

PBS : Phosphate Buffered Saline

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphorylEthanolamine

PEG : Polyethylene glycol

PI : PhosphatidylInositole

PL : PhosphoLipides

PS : PhosphatidylSerine

RITC : Rhodamine B – IsoThioCyanate

SL : SphingoLipides

TRITC : TetramethylRhodamine IsoThioCyanate

UV : UltraViolet

Avant – propos

La membrane biologique constitue une barrière d'importance cruciale pour la vie ; la possibilité de contrôler sa perméabilisation aussi. Le but de ces travaux de thèse est d'étudier la possibilité de perméabiliser la bicouche lipidique de façon contrôlée et peu invasive, en utilisant la lumière. Dans ce but, un polymère amphiphile modifié azobenzène (AMP) est utilisé. Les motifs azobenzènes, greffés sur des squelettes des acides poly (acryliques), peuvent avoir deux conformations (*cis* et *trans*) ; cette isomérisation est photoactivable. Il est donc possible de modifier le taux d'hydrophobie de la molécule en utilisant des flashes de lumière de longueurs d'onde adaptées, la rendant ainsi capable de provoquer des perturbations de la bicouche d'importance variable. L'hypothèse de ce travail est que la présence de l'AMP perturbe la membrane et que la conformation la plus hydrophobe (*trans*) pourrait déstabiliser suffisamment la membrane pour induire sa perméabilisation.

Dans la première partie de l'introduction de ce manuscrit, sont donnés des éléments sur la membrane plasmique : sa composition, l'importance et le rôle des lipides, ainsi que la structure de la bicouche lipidique. Les membranes modèles utilisées pendant ces travaux de thèse sont également brièvement décrites. Ensuite, les propriétés mécaniques de la membrane et les déformations membranaires sont présentées et l'importance de la perméabilité de la membrane plasmique est soulignée.

Le rôle crucial et différentes approches de la perméabilisation membranaire sont mentionnés dans une deuxième partie de l'introduction. L'AMP est présenté et les raisons pour lesquelles l'effet de l'AMP mérite d'être étudié sont expliquées. Les résultats de l'effet des polymères des générations précédentes testés dans le même but sont mentionnés.

Dans le premier chapitre de la partie expérimentale, la perméabilisation des vésicules géantes unilamellaires (GUV) est mise en évidence. La microscopie de contraste de phase et de fluorescence, techniques utilisées pour les expériences de cette partie, sont présentées

en début de chapitre. Suivent, les méthodes de traitement des données obtenues et les résultats, ainsi que leur interprétation.

Les structures de perméation ainsi détectées ont été étudiées en réalisant des expériences d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM). La technique est présentée au début du deuxième chapitre. Les résultats obtenus sont indiqués, révélant aussi l'hétérogénéité des structures créées. La forme et la taille des structures de perméation sont étudiées et une corrélation avec la concentration de l'AMP utilisée est tentée. À la fin du chapitre, un modèle est proposé.

Dans le dernier chapitre de la partie expérimentale, l'effet de l'AMP sur des cellules est examiné. La fuite de molécules introduites initialement dans les cellules est suivie. Ensuite, la possibilité d'utiliser l'AMP dans le but de faire rentrer une petite molécule est présentée. Les techniques utilisées sont brièvement expliquées.

Après une conclusion générale, quelques perspectives seront données.

A. INTRODUCTION

I. La membrane biologique

La membrane biologique représente une barrière hydrophobe sélective entre deux milieux, un milieu interne et un milieu externe, qui *a priori* peut avoir des compositions et des propriétés très différentes. Elle est présente dans tous les organismes vivants. Toutes les cellules, qui sont l'unité principale de la vie, sont délimitées par une membrane (membrane plasmique), il en est de même pour les différents organites qu'elles contiennent. Les rôles principaux de la membrane plasmique sont la délimitation de la taille et de la forme de la cellule, ainsi que le maintien des différences indispensables entre son intérieur et son extérieur. À l'intérieur de la cellule, un ensemble organisé de "polymères" biologiques lui confèrent la plupart de ses propriétés mécaniques (cytosquelette).

Plus précisément, la membrane permet de maintenir des concentrations différentes d'électrolytes entre l'intérieur et l'extérieur, ainsi que le gradient du champ électrique. Elle assure les échanges avec l'extérieur et la reconnaissance entre les cellules. D'ailleurs, elle constitue un site stable pour la liaison, ainsi que la catalyse des enzymes. En même temps, elle est suffisamment flexible en permettant de cette manière les changements de forme et de taille nécessaires pour le fonctionnement de la cellule. De plus, elle peut fusionner avec d'autres membranes. La membrane cellulaire est le premier site de réception de tous les signaux extracellulaires et des molécules qui déclenchent différentes activités cellulaires.

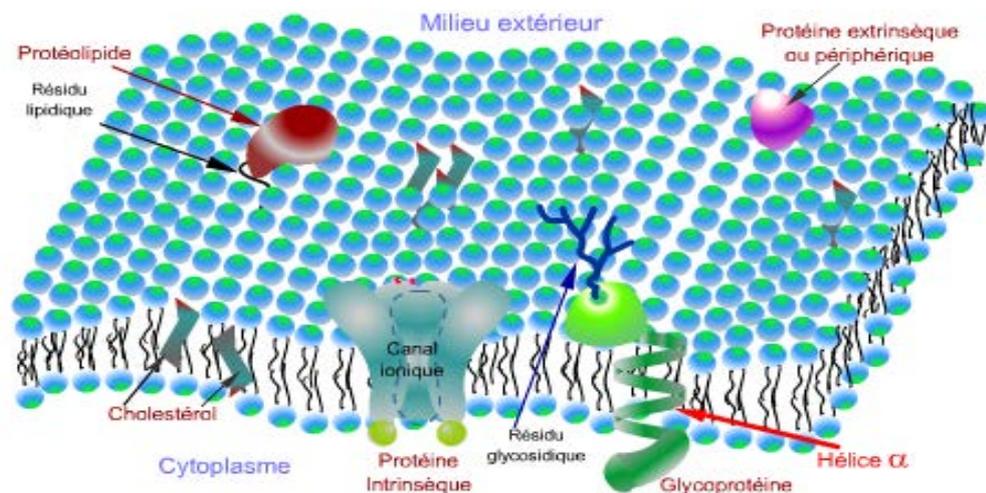


Figure I.1 : Une représentation schématique de la membrane plasmique.

Il s'agit d'un système dynamique constitué par une bicouche lipidique (les lipides représentent environ la moitié de sa masse) qui joue le rôle de la « matrice » de la membrane. Les lipides constituant la membrane biologique sont des molécules amphiphiles (qui possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe) qui s'organisent en bicouche afin de minimiser l'énergie - d'éliminer donc les interactions entre les parties apolaires des lipides et les molécules d'eau : les parties hydrophobes sont protégées à l'intérieur et les parties hydrophiles sont en contact avec les molécules d'eau (Jain 1988). Dans cette matrice lipidique sont insérées d'autres molécules : essentiellement des protéines (à peu près l'autre moitié de la masse, donc beaucoup moins en terme de nombre de molécules – environ 50 molécules de lipides pour une molécule de protéine), ainsi que des glycoconjugués (glycolipides ou glycoprotéines) en relativement faible quantité. Les proportions relatives dans les membranes varient selon l'espèce considérée. Le fait que la membrane constitue un système dynamique, chargé de différents rôles, est lié au mouvement de ses différents composants et des interactions entre eux (Boesze-Battaglia and Schimmel 1997).

	Lipides	Protéines	Carbohydrates
Globules Rouges	43	49	8
Cellule hépatique	36	54	10
Amoeba (amibe)	42	54	4

Tableau I.1 : Les pourcentages (w/w) des différentes molécules constituant la membrane plasmique de différentes cellules. Données extraites de (Guidotti 1972).

La bicouche forme une barrière délimitant la cellule qui ne permet aux molécules polaires (tels que les acides aminés, les acides nucléiques, les carbohydrates, les protéines ou les ions) de la traverser que par des mécanismes modulés, qui sont cruciaux pour la vie de la cellule (cf paragraphe I.4.a). La membrane a une épaisseur d'environ 5 nm.

Dans la bicouche lipidique de la membrane sont insérées des **protéines** qui la traversent (protéines transmembranaires) ou qui y sont insérées sans la traverser, soit du côté intracellulaire soit du côté extracellulaire. Leur taux d'insertion est relié à leurs parties hydrophiles et hydrophobes. Autres protéines, les protéines « membranaires périphériques », sont liées à la surface de la membrane, soit avec des oligosaccharides, soit avec d'autres protéines.

Un des rôles cruciaux des protéines membranaires concerne le transport des ions - ou

d'autres molécules polaires - à travers la membrane biologique. Ce rôle peut être passif, comme dans le cas des canaux ioniques ou des récepteurs - canaux, ou actif, comme dans le cas des pompes (énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP) et des transporteurs (énergie fournie par un gradient ionique).

Les lipides avec lesquels les protéines sont en contact jouent un rôle crucial sur leur activité (Boesze - Battaglia and Schimmel 1997). Il y a des protéines qui ne peuvent fonctionner qu'en présence de phospholipides spécifiques, comme par exemple les enzymes qui demandent des ions particuliers dans les solutions aqueuses. De plus, quelques enzymes du cytosol (la partie intracellulaire) se lient de façon spécifique à certaines têtes des lipides du feuillet interne et sont ainsi recrutées et concentrées sur des sites spécifiques de la membrane (Alberts B 2002).

Protéine membranaire	Lipide régulateur	Effet	Références
Transporteur mitochondrial d'ADP/ATP	Cardiolipide	Nécessaire pour le transport des nucléotides	Beyer et Klingenberg (1985)
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Cholestérol	Nécessaire pour l'activité	Yeagle <i>et al</i> (1988) Esmann and Marsh (1985)
Anion transport (Band 3)	Cholestérol	Nécessaire pour l'activité	Klappauf et Schubert (1977) Schubert and Boss (1982)
ATPase calcium du réticulum sarcoplasmique	Phosphatidyléthanolamine	Nécessaire pour l'activité	Cheng <i>et al</i> (1986) Hildago <i>et al</i> (1982)
Glycophorine	Phosphatidylinositol	Nécessaire pour l'activité	Yeagle and Kelsey (1989)
Glycophorine	Phosphatidylinositol phosphates	Facilite l'association au cytosquelette	Anderson et Marchesi (1985) Anderson et Lovrien (1984)
β -Hydroxybutyrate dehydrogenase	Phosphatidylcholine	Nécessaire pour l'activité	Isaacson <i>et al</i> (1979)

Tableau 1.2 : Exemples de lipides jouant un rôle crucial sur le fonctionnement de certaines protéines. Tableau d'après (Boesze - Battaglia and Schimmel 1997).

Les **carbohydrates (glycoconjugués)** de la membrane plasmique représentent environ 5% en masse. Ce sont de courtes chaînes glucidiques, souvent branchées, liées covalamment à des protéines ou à des lipides. Les glycoconjugués chez les eucaryotes se trouvent uniquement sur le feuillet externe de la membrane plasmique.

Les caractéristiques de la matrice lipidique de la membrane, dépendent de ses composants lipidiques. De nos jours, il est montré que le rôle de la membrane et des lipides est loin de n'être qu'une structure de support, puisque les données scientifiques obtenues en Biophysique, en Chimie et en Biologie montrent que les lipides sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires, comme la signalisation intracellulaire ou la régularisation, ainsi que l'activation des différents processus.

Dans la partie introductive de ces travaux de thèse, nous allons nous concentrer essentiellement sur la présentation des lipides, leurs propriétés et leur importance pour la vie de la cellule.

I.1. Les lipides

Presque 5% des gènes des cellules sert à synthétiser des lipides (van Meer, Voelker *et al.* 2008). Même si aujourd'hui le rôle important des lipides pour la vie de la cellule est reconnu dans tous les domaines des sciences de la vie, la totalité de leurs fonctions est loin d'être clarifiée. Les lipides servent par exemple pour le stockage d'énergie (triglycérides, esters de stéryle) ou pour la constitution de la membrane plasmique.

I.1.a. La géométrie et les phases des lipides

Parmi les lipides polaires, trois classes sont distinguées selon leurs propriétés physico-chimiques et plus précisément en fonction de leur interaction avec l'eau. Les classes I et II contiennent les lipides insolubles dans l'eau, alors que la classe III contient les lipides solubles dans l'eau. Les lipides membranaires sont les lipides des classes I et II, dont la caractéristique commune est la capacité à former une monocouche stable à l'interface entre un milieu aqueux et l'air. La différence entre les deux classes réside dans le lyotropisme des lipides, c'est à dire de leur capacité à former des structures qui gonflent dans l'eau. La classe I contient les lipides qui ne gonflent pas dans l'eau (comme le cholestérol), tandis que la classe II contient les lipides lyotropes (par exemple les phospholipides). La classe III, représentant les lipides solubles, elle est divisée en deux

catégories : les lipides de la classe III A qui sont lyotropes et peuvent former des monocouches (comme les lysolipides) et ceux de la classe III B (comme les sels biliaires) qui ne le peuvent pas, leur solubilité étant trop élevée.

Les lipides polaires, de manière générale, sont composés par une tête polaire hydrophile et des chaînes hydrophobes.



Figure I.2 : La structure d'un lipide polaire.

En fonction de la concentration et de la température, les lipides se trouvent soit sous forme monomère, soit en micelles, soit en agrégats. Pour les lipides capables de former des micelles et si la température du système est supérieure à une température critique, appelée température de Krafft, on définit la **concentration micellaire critique (CMC)** comme la concentration à partir de laquelle la première micelle apparaît. En dessous de la CMC, les lipides sont uniquement sous forme monomère, alors qu'au-delà de cette concentration les monomères sont en équilibre avec les micelles de plus en plus nombreuses (figure I.3). La CMC est caractéristique de chaque molécule amphiphile formant des micelles et elle est influencée par la température, la force ionique et le pH.

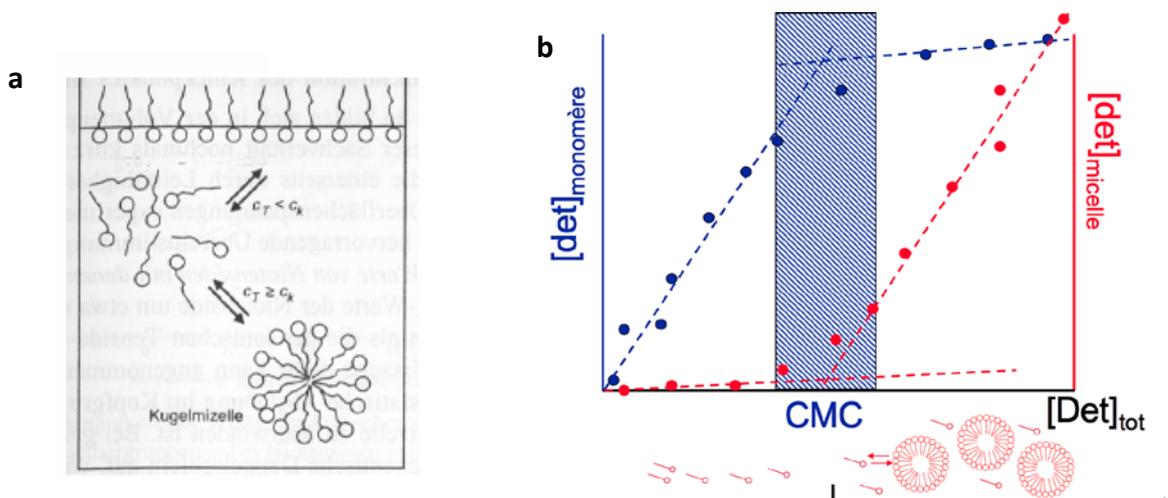


Figure 1.3 : La CMC est définie comme la concentration à partir de laquelle la première micelle apparaît. La micellisation des monomères à partir de la concentration critique CMC est montrée à gauche (a) et le diagramme correspondant à droite (b) : Au-delà de la CMC les monomères sont en équilibre avec les micelles de plus en plus nombreuses.

Quand ils se trouvent dans un environnement aqueux, les lipides polaires s'auto-organisent et forment des agrégats, dont la géométrie est le résultat de la minimisation d'énergie. Quelques types d'agrégats sont présentés à la figure I.4.

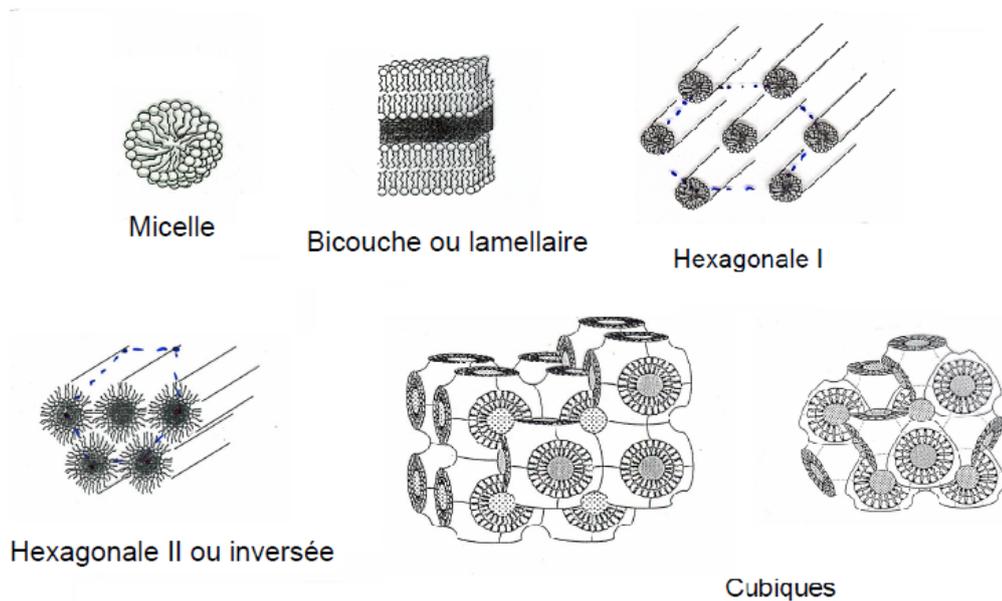


Figure I.4 : Les structures de différents agrégats lipidiques qui peuvent être formés.

Malgré l'importance de toutes ces phases et structures, cette introduction est centrée sur la structure de la bicouche, puisqu'il s'agit de la forme la plus intéressante concernant la membrane plasmique. Cependant, il faut noter que d'autres structures intermédiaires peuvent être adoptées localement par la membrane dans des cas spécifiques, comme la fusion et la perméabilisation membranaire.

En 1985, Israelachvili (Marra and Israelachvili 1985) a introduit le paramètre d'empilement p ("packing parameter") qui décrit la molécule, en tenant compte de sa composition, sa structure et des conditions de l'environnement. Des agrégats sont préférentiellement formés pour chaque géométrie lipidique (figure I.6). Ce paramètre est une fonction de la longueur maximale que peuvent prendre les chaînes d'hydrocarbure (L_c), de l'aire par tête polaire projetée à l'interface (a_0) et du volume hydrophobe (V_0) - montrés figure I.5 - et elle

est donnée par la relation
$$p = \frac{V_0}{a_0 \cdot L_c} .$$

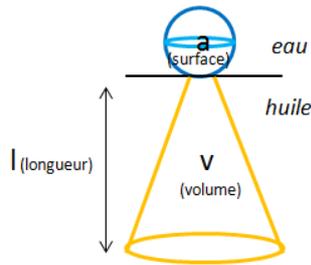
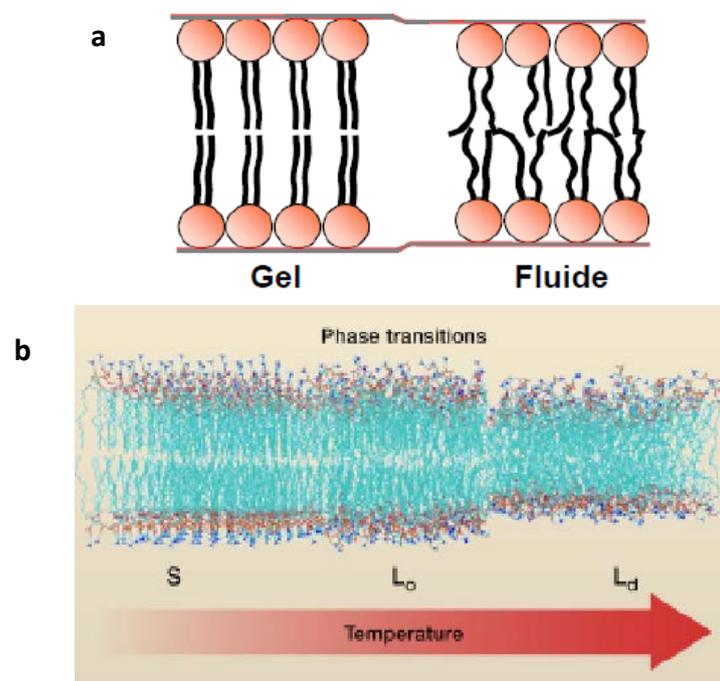


Figure 1.5 : La dépendance de p avec les 3 paramètres : la longueur maximale des chaînes hydrocarbonées, l'aire par tête polaire et le volume hydrophobe.

$p = \frac{v}{a_0 l_c}$	Lipide	Forme de la molécule	Structures formées
$< 1/3$	surfactant à une chaîne: SDS avec faible salinité ...	 cône	micelle
$1/3 - 1/2$	lipide à une chaîne avec petite tête polaire: SDS ou CTAB avec forte salinité ...	 cône tronqué	micelle cylindrique
$1/2 - 1$	lipide à deux chaînes, fluides: Phosphatidyl choline, sphingomyéline ...	 cône tronqué	bicouche flexible, vésicule
1	lipide à deux chaînes avec petite tête polaire: Phosphatidyl-éthanolamine ...	 cylindre	bicouche plane
> 1	chaînes insaturées, hautes températures: Cardiolipine avec calcium ...	 cône tronqué inverse	micelle inverse

Figure 1.6 : Le paramètre d'empilement p , la géométrie d'empilement et le type d'agrégat formé. Figure adaptée du (Israelachvili 1992).

Les changements de température et le niveau de présence de certains lipides modifient leur état physique (leur **phase**) et par conséquent la fluidité d'une monocouche lipidique. En dessous d'une température, appelée **température de transition** (T_m), le degré de liberté et l'arrangement spatial des chaînes des lipides changent et la monocouche se trouve en phase gel (L_β). Les chaînes de lipides sont plutôt parallèles entre elles et la surface occupée par les lipides est moins importante. Dans ce cas – là, le mouvement des chaînes est limité, ainsi que la diffusion des lipides. Au-dessus de la température de transition, les bicouches sont en phase fluide (L_α) : les lipides peuvent diffuser librement. Dans la phase liquide – qui est la phase la plus pertinente en biologie – deux sous-catégories sont distinguées : la phase liquide ordonnée (L_o) et la phase liquide désordonnée (L_d). Les lipides qui se trouvent en phase L_d ont une liberté conformationnelle plus importante et des coefficients de diffusion supérieurs à ceux de la phase L_o . À des températures physiologiques les deux phases peuvent coexister dans la bicouche lipidique. Afin de minimiser le contact entre les parties hydrophobes et les parties hydrophiles, les lipides en phase L_o se rassemblent en formant des domaines, souvent impliqués dans des fonctions biologiques importantes.



Les différentes phases dans lesquelles peuvent se trouver les lipides (ou un mélange de lipides), incluant les différentes phases lamellaires, peuvent être représentées dans un diagramme de phases qui montre les changements dans l'organisation des molécules en fonction de différents paramètres, comme la concentration en lipides et la température. Le diagramme de phase de la figure I.8 illustre le fait que même pour un seul type de lipide, différentes structures peuvent se former. Le lipide ici est la monooléine, un lipide monocaténaire. En observant ce diagramme, différentes structures présentées dans le tableau de la figure I.6 peuvent se retrouver, ainsi que les différentes phases lamellaires.

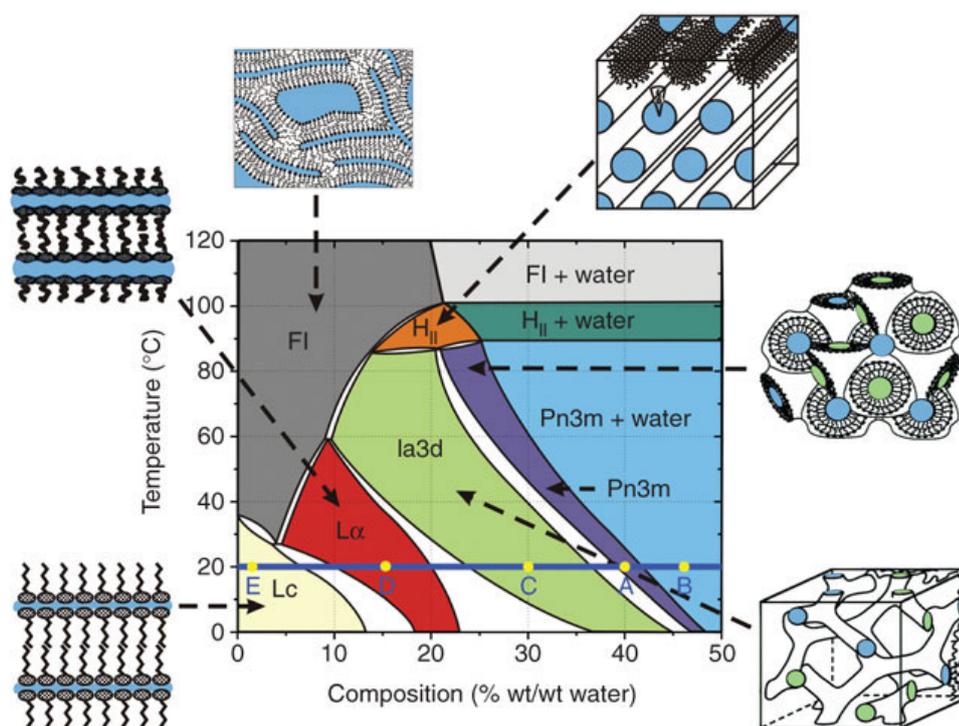


Figure I.8 : Un exemple de diagramme de phases (en fonction de la concentration et de la température) pour le mélange monooléine (MO)/eau. La MO est un lipide monocaténaire très utilisé en cristallisation des protéines membranaires dans LCP (phase lipidique cubique). Re – tracé par (Briggs 1996), tiré de (van Meer, Voelker *et al.* 2008).

Dans la monocouche, les lipides peuvent tourner autour de leur axe (rotation axiale) ou diffuser latéralement (ce qui correspond à l'échelle moléculaire à une succession d'échanges entre deux lipides voisins). Au sein de la bicouche les lipides peuvent passer d'un feuillet à l'autre (diffusion transverse, « flip – flop ») ; Ce mouvement nécessite le passage de la tête polaire à travers la membrane, ce qui fait de ce mouvement un mouvement lent (comparé au deux précédents). Les temps caractéristiques de chaque type de mouvement sont indiqués figure I.9 (Alberts B 2002).

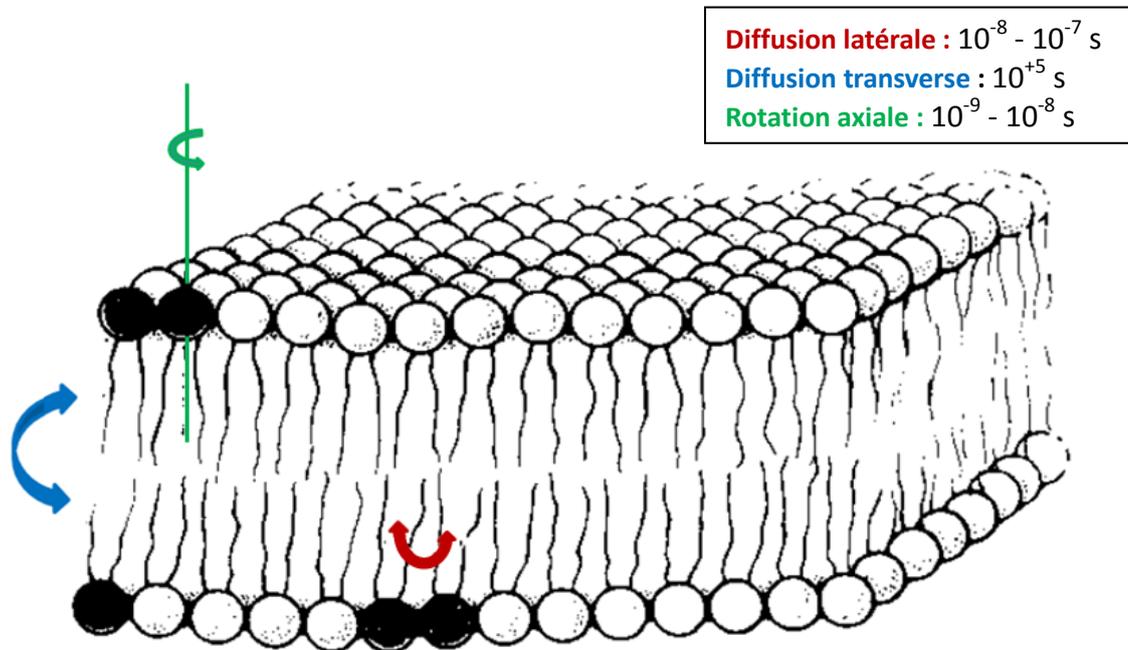


Figure I.9 : Les différents mouvements que les lipides peuvent effectuer. La diffusion latérale (représentée en rouge), la diffusion verticale ou transverse (représentée en bleu) et la rotation autour de leur axe (représentée en vert).

A l'échelle moléculaire il existe aussi des mouvements des chaînes d'acides gras, dont le temps caractéristique est de 10^{-12} s. Les mouvements « collectifs », concernant l'ensemble de la membrane, incluant la courbure, l'étirement et la compression de la bicouche, seront abordés plus tard dans ce chapitre d'introduction (paragraphe I.3).

I.1.b. Les lipides de la membrane plasmique

Comme déjà mentionné, presque la moitié de la masse de la membrane plasmique est due aux lipides. Il existe différents types de lipides différenciés selon leur groupe polaire, leur longueur de chaîne, leur degré d'insaturation. La composition de la membrane est aussi différente selon le type de cellule, mais les phospholipides (glycérophospholipides et sphingolipides) et les stérols restent le plus souvent les lipides les plus abondants de la membrane plasmique (Cevc 1987; Leterrier 1989).

- Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides possèdent sur leur tête polaire un squelette glycérol, un groupement acide phosphorique chargé négativement et un groupe supplémentaire qui confère au lipide son « identité », ils possèdent aussi deux chaînes hydrocarbonées, en

général des acides gras de différentes longueurs (14 à 24 atomes de carbone).

Les chaînes peuvent contenir des doubles liaisons, c'est-à-dire des insaturations. Chaque double liaison provoque la perte d'un degré de liberté (figure I.10), ce qui change la géométrie de la molécule et donc *a priori* le type d'agrégat qu'elle peut former. Ces propriétés des phospholipides influencent l'épaisseur et la fluidité de la membrane.

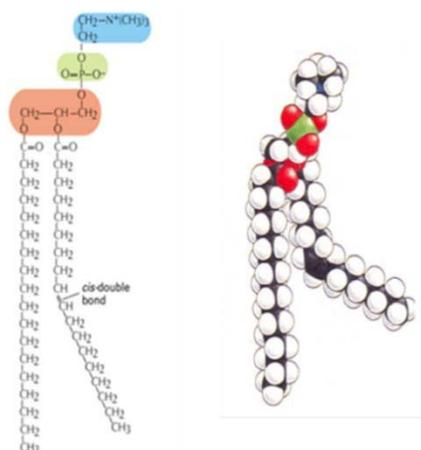


Figure I.10 : Les insaturations au niveau des chaînes hydrocarbonées des lipides provoquent la perte d'un degré de liberté. À gauche, le squelette glycérol est surligné en rouge, le groupement acide phosphorique en vert et en bleu le groupe qui confère au lipide son identité (ici la choline). À droite, les carbones sont représentés en noir, les hydrogènes en blanc, le phosphate en vert et les oxygènes en rouge. Tiré de (Alberts B 2002).

Les glycérophospholipides les plus abondants dans la membrane plasmique sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylethanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylinositol (PI) et l'acide phosphatidique (PA), tous présentés figure I.11. La PC, la PE, la PS et la PI sont les lipides qui forment le cadre structural et l'environnement qui définit les paramètres fonctionnels de chaque type cellulaire.

La PC est un lipide zwitterionique (neutre, mais dont les barycentres des charges positives et négatives ne coïncident pas) qui représente à peu près le 50% des phospholipides des cellules eucaryotes. Elle est très abondante dans les membranes animales et végétales. Elle a un rôle sur le maintien structural de la barrière hydrophobe de la membrane et joue aussi, en collaboration avec d'autres lipides, un rôle très important dans la signalisation cellulaire. La PC a une "géométrie" (au sens Israelachvilli) plus ou moins cylindrique, ce qui lui permet de former des bicouches. La PE est aussi très abondante dans la membrane cellulaire, surtout dans les membranes bactériennes. La petite taille de sa tête polaire, relativement à l'encombrement des chaînes, liée à sa capacité de former des liaisons d'hydrogène, lui permet de jouer un rôle dans le transport ou la stimulation. La PS est un lipide chargé négativement qui peut interagir électrostatiquement de manière non-spécifique et elle est essentiellement présente sur le feuillet interne de la membrane plasmique (et le feuillet externe des membranes des organelles). Son transfert vers le

feuillet externe de la membrane constitue un signal pour l'apoptose de la cellule. Elle joue un rôle important dans l'activation de plusieurs enzymes (Alberts B 2002).

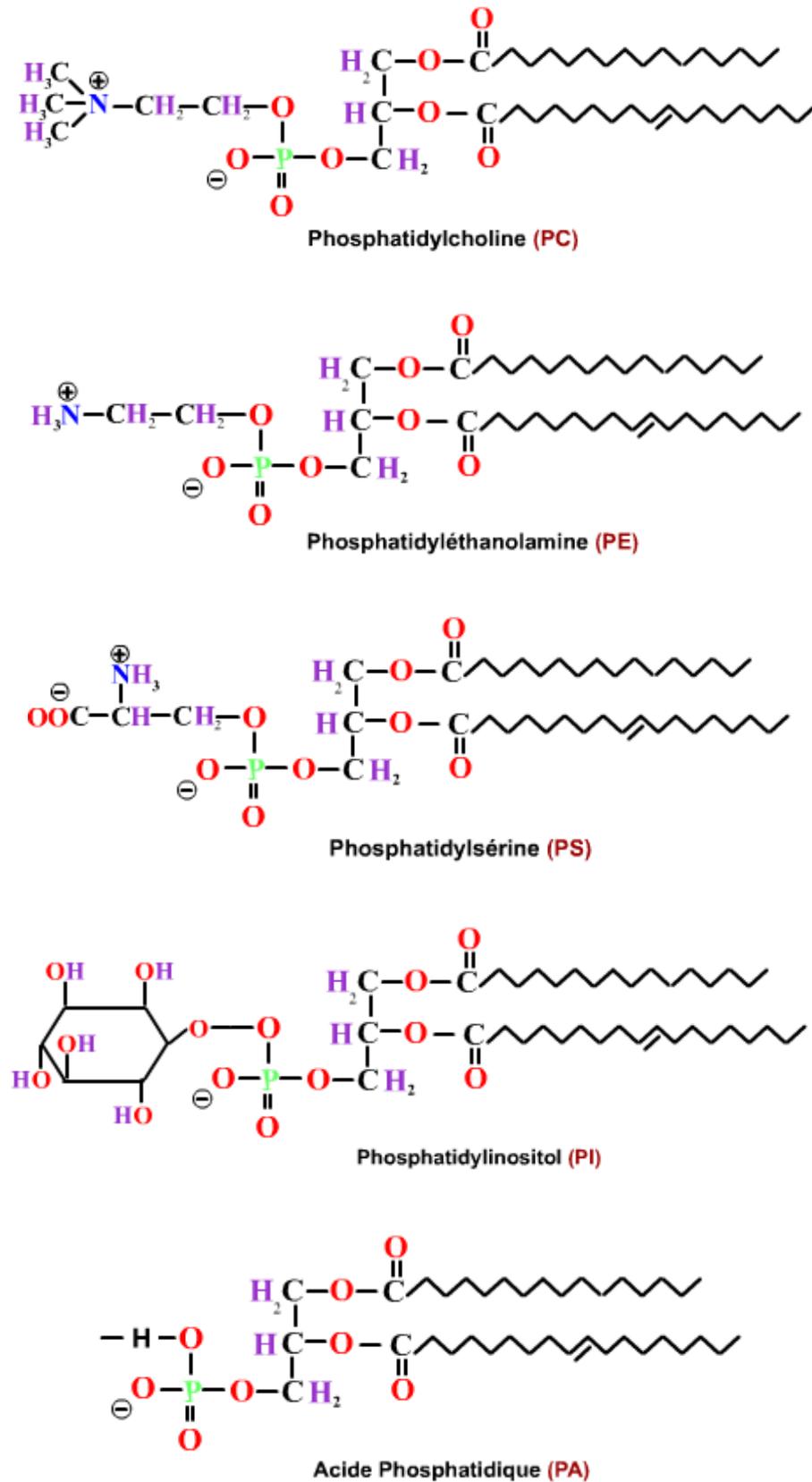


Figure I.11 : Les glycérophospholipides les plus abondants dans la membrane plasmique.

- Les sphingolipides

Les SL possèdent une base à longue chaîne qui peut être insaturée (sphingosine) ou saturée (dihydrosphingosine) liée à un acide gras par une liaison amide. Quand ils possèdent des chaînes saturées (ou *trans* – insaturées), les dernières leur permettent de former des cylindres plus hauts et plus étroits que ceux de la PC et de se compacter plus à longueur de chaîne identique.

Le sphingolipide le plus abondant dans les membranes cellulaires animales est la sphingomyéline (SM). Chez les érythrocytes humains elle représente presque le 25% du total des lipides (et est distribuée à 85% sur le feuillet externe). Elle est constituée d'une céramide (amide d'une sphingosine et d'un acide gras) et d'une tête polaire, la phosphocholine (même tête que la PC vue précédemment).

Contrairement à ce que l'on pensait auparavant, les sphingolipides ne sont pas que des éléments structuraux de la membrane plasmique. En effet la céramide (Cer) est une molécule qui est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires : la différenciation, la mort programmée, l'apoptose, la prolifération... Elle est considérée comme un messager secondaire et est impliquée dans des maladies du cerveau. La Cer peut être obtenue par hydrolyse de la sphingomyéline. Outre son rôle structural important, la SM a aussi un rôle fonctionnel qui est étudié de manière continue pendant ces dernières années.

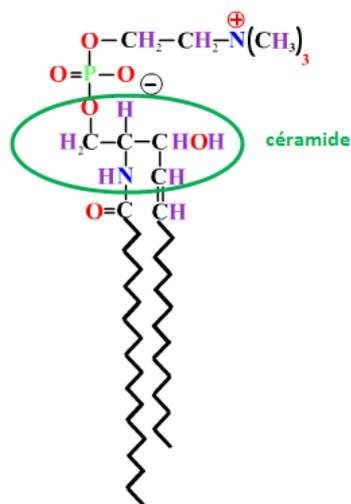


Figure I.12 : La sphingomyéline, le sphingolipide le plus souvent rencontré dans la membrane plasmique.

- Les stérols (le cholestérol)

Les stérols sont des lipides non lyotropes (classe I) extrêmement hydrophobes et d'importants constituants de la membrane cellulaire. Dans les cellules mammifères le cholestérol est le stérol majoritaire. Le cholestérol possède une structure de stéroïde contenant quatre cycles rigides et une courte chaîne d'hydrocarbures ramifiée. Sa seule composante hydrophile est due à la présence d'un groupement hydroxyle.

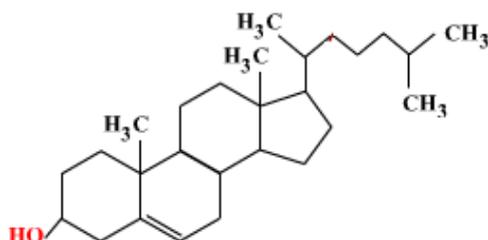


Figure I.13 : Le cholestérol

Il s'agit du deuxième lipide le plus abondant de la membrane plasmique (après les glycérophospholipides). Comme les phospholipides, le cholestérol n'est pas non plus distribué de manière homogène dans la bicouche. Sa structure et ses propriétés lui permettent de diminuer le mouvement des chaînes des phospholipides là où il est présent, ce qui résulte en la rigidification d'une partie de la membrane et éventuellement à la création de domaines plus rigides à la surface de la membrane. Sa contribution aux propriétés et au fonctionnement de la membrane est très importante, soit pour faciliter certains processus, soit pour en empêcher d'autres. Là encore, le pourcentage du cholestérol présent dans la membrane, avec les pourcentages respectifs des phospholipides, varie selon le type de la cellule (Boesze-Battaglia and Schimmel 1997).

lipide	cochon	humain	chat	lapin	cheval	rat
PC	13,9	17,5	18,7	22,3	22,0	31,8
PE	17,7	16,6	13,6	21,0	12,6	14,4
PS	10,6	07,9	08,1	08,0	09,4	07,2
PI	01,1	01,2	04,5	01,0	< 0,2	02,3
PA	< 0,2	00,6	00,5	01,0	< 0,2	< 0,2
SM	15,8	16,0	16,0	12,5	07,0	08,6
chol	26,8	26,0	26,8	28,9	24,5	24,7

Tableau I.3 : composition lipidique de la membrane plasmique des globules rouges de mammifères – pourcentages massiques (données extraites de (Andreoli 1987)).

I.1.c. L'asymétrie lipidique

La composition lipidique des deux feuillettes de la bicouche de la membrane plasmique des cellules eucaryotes est différente, ce qui est appelé asymétrie transverse. Entre les deux feuillettes il y a donc des différences de compositions chimiques et de propriétés physiques (charge, viscosité, pH, potentiel...). L'asymétrie lipidique est créée pendant la biogenèse des lipides et est conservée par des mécanismes et des transporteurs spécifiques. La faible vitesse de la diffusion transverse est un des paramètres de la stabilité de cette asymétrie de répartition des lipides dans la membrane.

La PC et les SL sont plutôt présents sur feuillet externe de la bicouche, alors que la PE et de la PS se trouvent principalement sur le feuillet interne. Concernant le cholestérol, sa distribution entre les deux feuillettes est l'objet de nombreuses discussions. Sa diffusion transverse spontanée étant beaucoup plus rapide que celle des phospholipides, il est difficile de définir s'il y a un feuillet dans lequel il est présent de manière préférentielle. Dans la littérature, des différentes méthodes utilisées donnent des résultats contradictoires.

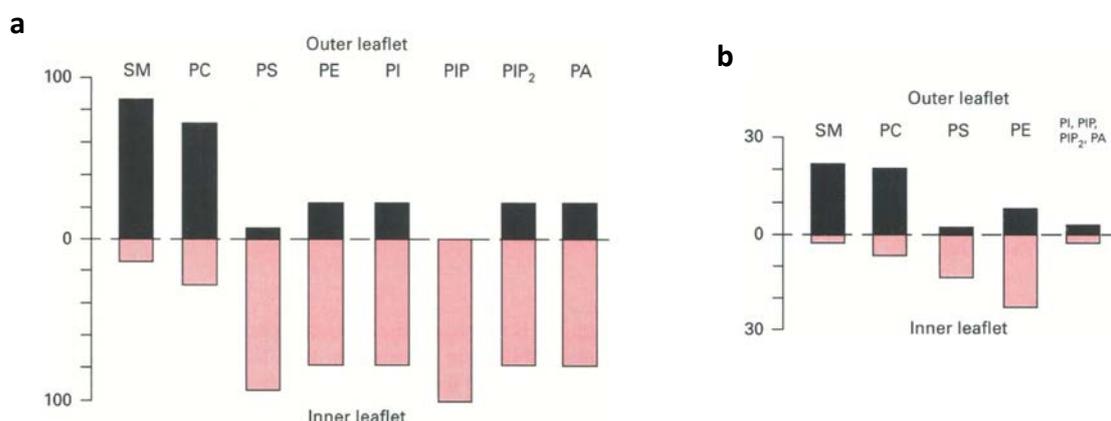


Figure I.14 : L'asymétrie lipidique de la membrane plasmique des globules rouges humains (a) en pourcentage de la quantité totale de chaque type de lipide et (b) en pourcentage totale des lipides. (Zachowski 1993)

Cette asymétrie lipidique a été montrée comme nécessaire pour plusieurs fonctions et processus cellulaires : la stabilité mécanique, le maintien de la structure de certaines organelles, l'ancrage des protéines spécifiques, la polarité de la cellule... Sa perte joue aussi un rôle important, puisqu'elle peut déclencher des processus cruciaux comme l'apoptose de la cellule ou un autre signal pour le cycle cellulaire, par l'apparition sur un des feuillettes de phospholipides spécifiques du feuillet opposé.

Plusieurs paramètres ont été examinés comme vitaux concernant les mécanismes possibles pour le maintien de cette distribution asymétrique des phospholipides dans la membrane biologique : les interactions des lipides avec des protéines du cytosquelette, l'effet du champ électrique transmembranaire et la courbure membranaire. La perception actuelle est l'existence de transporteurs spécifiques : une famille de protéines appelées « flippases » (Devaux 1991).

Les flippases sont des protéines spécifiques qui permettent le transport des lipides d'un feuillet à l'autre de la membrane plus ou moins sélectivement. On distingue la flippase, la floppase (ATP – dépendantes) et la scramblase (diffusion facilitée, ATP – indépendante). Les scramblases redistribuent les lipides de manière non spécifique, entraînant la perte de l'asymétrie membranaire.

1.2. Les membranes - modèles

Afin d'étudier les différents phénomènes complexes qui impliquent la membrane biologique, il est nécessaire d'avoir la possibilité de simplifier, de modéliser et de modifier la composition et/ou l'environnement. Cela est possible à l'aide des membranes modèles. Une membrane modèle est une bicouche lipidique artificielle, dont on peut contrôler la composition et l'environnement.

Il existe plusieurs types de membranes modèles avec des avantages et des inconvénients spécifiques de chacune (Chan and Boxer 2007). La membrane modèle appropriée est choisie en fonction de la propriété, du phénomène ou de l'interaction qui est étudiée, ainsi que selon les limitations de la technique d'étude envisagée.

Un des modèles largement utilisés est les liposomes. Il s'agit de bicouches lipidiques refermées sur elles-mêmes, qui isolent ainsi un compartiment interne aqueux d'un compartiment externe aussi aqueux - de la même manière que la membrane sépare les milieux intra et extracellulaire. Leur diamètre varie de quelques nm à quelques μm et ils peuvent être unilamellaires (une seule bicouche) ou multilamellaires (plusieurs bicouches refermées sur elles – mêmes). Les vésicules unilamellaires sont classées en trois catégories selon leur taille : les petites (Small Unilamellar Vesicles - SUV, quelques dizaines de nm), les

grandes (Large Unilamellar Vesicles – LUV, entre 100 nm et 500nm) et les géantes (Giant Unilamellar Vesicles – GUV, quelques dizaines de μm).

Les deux types de membranes - modèles utilisées dans le cadre de ce travail sont les Vésicules Géantes Unilamellaires (GUV) et les films noirs (Black Lipid Membrane - BLM - ou Planar Lipid Bilayers).

1.2.a Les Vésicules Géantes Unilamellaires (Giant Unilamellar Vesicles – GUV)

Les GUV sont des vésicules lipidiques dont le diamètre varie entre 5 et 100 μm . Un de leurs grands avantages est que leur taille est similaire à celle des cellules, ce qui permet de les utiliser afin d'étudier spécialement des phénomènes qui sont liés à la courbure de la cellule, sans exclure bien sûr d'autres études sur la perméabilité non liées aux contraintes « mécaniques », la fluidité, l'ancrage des molécules ou la fusion des membranes en générale. De plus, leur dimension permet de les observer en microscopie optique. Elles sont souvent utilisées pour étudier des phénomènes trop complexes pour être traités directement en utilisant des cellules, comme la fusion membranaire.

Bien sûr, en fonction des lipides utilisés pour leur fabrication, les vésicules peuvent présenter des propriétés physicochimiques différentes (rigidité, charge,...). Les tampons utilisés et les différentes conditions de l'environnement jouent aussi un rôle très important (pH, osmolarité, température).

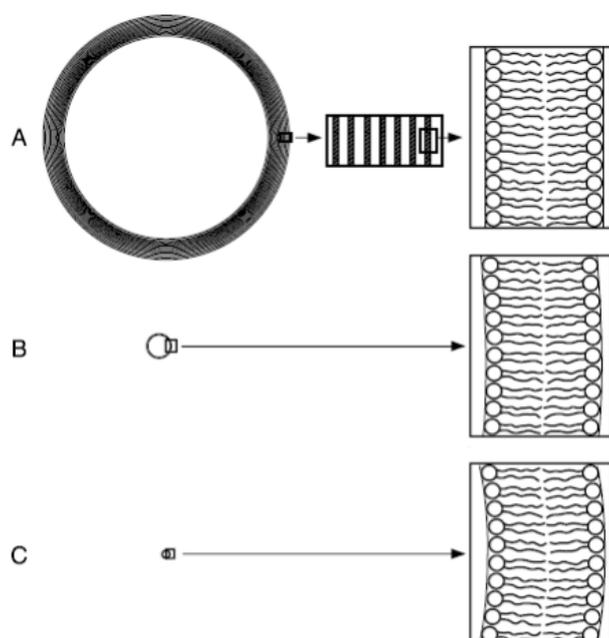


Figure 1.15 : Afin d'étudier des phénomènes liés à la courbure de la membrane, le bon type de liposomes doit être choisi. L'utilisation des GUV nous permet d'étudier des phénomènes liés à la courbure de la membrane plasmique et à des contraintes mécaniques associées, vu leur diamètre similaires. Les différences à la courbure : A. des vésicules multilamellaires (MLV), B. des grands vésicules unilamellaires (LUV) et C. des petites vésicules unilamellaires (SUV), figure modifiée de (Walde and Ichikawa 2001).

Diverses molécules, autres que les lipides constitutifs, peuvent être incorporées dans les vésicules pendant leur fabrication, comme par exemple des protéines (protéoliposomes) (Banerjee and Datta 1983; Ciancaglini, Simão *et al.* 2012), des polymères (polymersomes) (Thiele, Abate *et al.* 2010; Gaitzsch, Appelhans *et al.* 2011) et autres (Reinhardt, Lindemann *et al.* 1984; van Rensen, Wauben *et al.* 1999). De la même façon, des sondes fluorescentes hydrophobes peuvent être introduites dans le mélange lipidique de préparation, de manière que la bicouche puisse ensuite être repérée et observée en fluorescence.

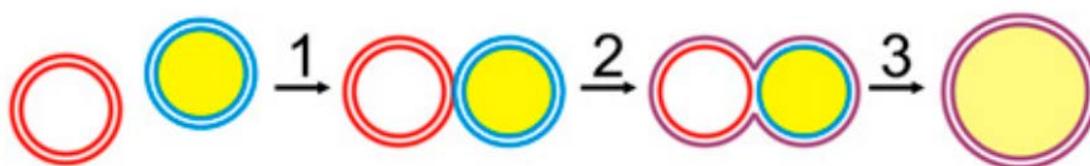


Figure I.16 : Des phénomènes difficiles à suivre dans les cellules, comme par exemple la fusion membranaire, peuvent être étudiés à l'aide des liposomes et des sondes fluorescentes incorporées dans la bicouche ou encapsulées, comme par exemple pour l'étude de la fusion membranaire. Des différentes sondes fluorescentes préalablement incorporées ou encapsulées dans des vésicules différentes se trouvent à la fin dans une seule vésicule, en modifiant ainsi la longueur d'onde d'émission (quand observées en microscopie de fluorescence) et en mettant en évidence la fusion membranaire. Figure tirée de (van den Bogaart and Jahn 2011).

Il y a plusieurs méthodes pour préparer des liposomes qui s'appuient toutes sur le gonflement par hydratation d'un film lipidique sec. Selon la taille et l'unilamellarité souhaitées la méthode diffère. Au cours de l'étape de l'hydratation les bicouches lipidiques se décollent et referment sur elles – mêmes. Pour les GUV, la méthode la plus utilisée est la méthode d'électroformation (Angelova and Dimitrov 1986; Lorin, Aur *et al.* 2004; Rodriguez, Pincet *et al.* 2005).

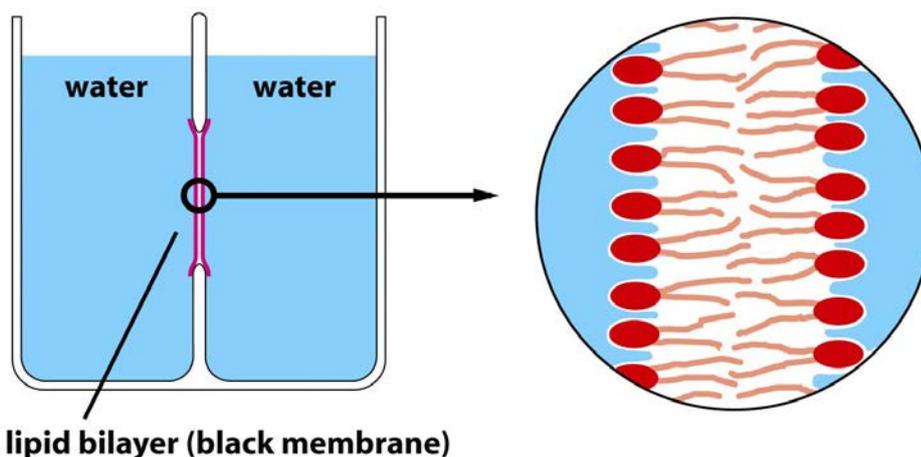
Concernant leurs applications, les vésicules lipidiques sont très utilisées en thérapeutique et cosmétologie. En effet, leur capacité à véhiculer différentes substances dans l'organisme (comme des médicaments, des antioxydants et autres), fait qu'elles servent souvent de transporteurs de telles molécules. Ces molécules peuvent être solubles (encapsulées donc dans le liposome) ou non (introduites dans la membrane). Les vésicules peuvent entrer dans l'organisme par simple injection, puis *via* de fusion membranaire ou endocytose libérer leur contenu à l'endroit approprié. Cette utilisation des liposomes sera plus détaillée au paragraphe II.1.

I.2.b Les films noirs (Black Lipid Membranes – BLM)

Un autre modèle de membrane largement utilisé en biophysique est le film noir (Black Lipid Membrane - BLM ou planar lipid bilayers). Leur nom est dû à ce qui est observé en microscopie optique lors de leur fabrication, à cause des interférences de la lumière (combinaisons entre ondes lumineuses qui arrivent en même temps sur le même point, qui s'additionnent et s'annulent mutuellement).

Il s'agit de la création dans un milieu aqueux d'une bicouche lipidique plane, dans laquelle différentes molécules peuvent être insérées, nous donnant la possibilité de suivre l'évolution du système. La bicouche est formée - à partir de lipides solubilisés dans un alcane - dans un trou d'un matériau inerte qui sépare deux compartiments remplis d'un électrolyte (figure I.17). Un des avantages de cette membrane modèle est que la bicouche est accessible par les deux faces.

Les BLM permettent l'étude du transport fonctionnel à travers la bicouche lipidique dans des conditions contrôlées (concentration, force ionique, pH, champ électrique). De plus, il est possible d'avoir des conditions différentes de deux côtés de la membrane. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour la formation du film noir.



lipid bilayer (black membrane)
Figure I.17 : Représentation schématique d'une BLM. Image tirée de (Alberts B 2002).

Le système BLM consiste d'un système physicochimique hétérogène de différentes phases qui tendent à s'équilibrer entre elles. Il n'est pas un système en équilibre par nature : du travail doit être fourni pour la formation du film lipidique. Mais une fois la BLM formée, le

système peut rester stable pendant plusieurs heures, puisqu'il s'agit d'un état métastable (minimum local d'énergie potentiel).

Cet équilibre du système est influencé par la quantité d'alcane (utilisé pour solubiliser les lipides) d'une part et la concentration des lipides dans le dépôt d'autre part. En effet, les lipides doivent être suffisamment dilués pour être situés en dessous de la CMC, mais suffisamment nombreux pour former une bicouche. Le volume d'alcane doit rester relativement faible car après la formation du film l'alcane reste toujours présent autour du trou dans lequel la bicouche est formée. D'autres paramètres jouent un rôle crucial sur la formation, la stabilité et la nature de la bicouche, ce sont bien sûr la nature des lipides et de l'alcane utilisé pour leur solubilisation, les concentrations en sel, le champ électrique, le temps, les conditions de l'environnement (par exemple l'humidité), etc. (Ti Tien 1974; Ti Tien 1985; Baba, Toshima *et al.* 1999).

I.3. Déformations membranaires

Pour que la membrane puisse « être à la hauteur » de son rôle, structurant ainsi que fonctionnel, sa cohésion, les forces intermoléculaires et les forces entre surfaces, est très importante. Elle doit garder son rôle de compartimentation et en même temps assurer d'autres fonctions vitales pour la cellule : la communication entre les différents milieux et la signalisation. En effet, une des voies pour la signalisation cellulaire nécessite des déformations membranaires, des vésicules et des tubules étant échangées entre deux sites ou deux compartiments « donneur » et « récepteur ». Le caractère dynamique de la membrane est donc très important et ses propriétés mécaniques constituent le paramètre crucial pour sa déformation et les processus de fusion et de fission membranaire. Toute déformation de la bicouche lipidique peut être décrite par une combinaison de trois modes de déformation : l'élasticité de courbure, le cisaillement et la compressibilité (Evans 1987; Sackmann 1994) (figure I.18).

I.3.a. Propriétés mécaniques de la bicouche lipidique

La membrane plasmique est très adaptable concernant la courbure et le cisaillement, mais présente une très faible compressibilité latérale.

Les différentes formes de la membrane plasmique sont définies par les interactions entre les lipides ou des complexes des lipides et des protéines. Pour la plupart des cas et surtout pour les courbures importantes de la membrane, le temps de vie est limité (McMahon and Gallop 2005).

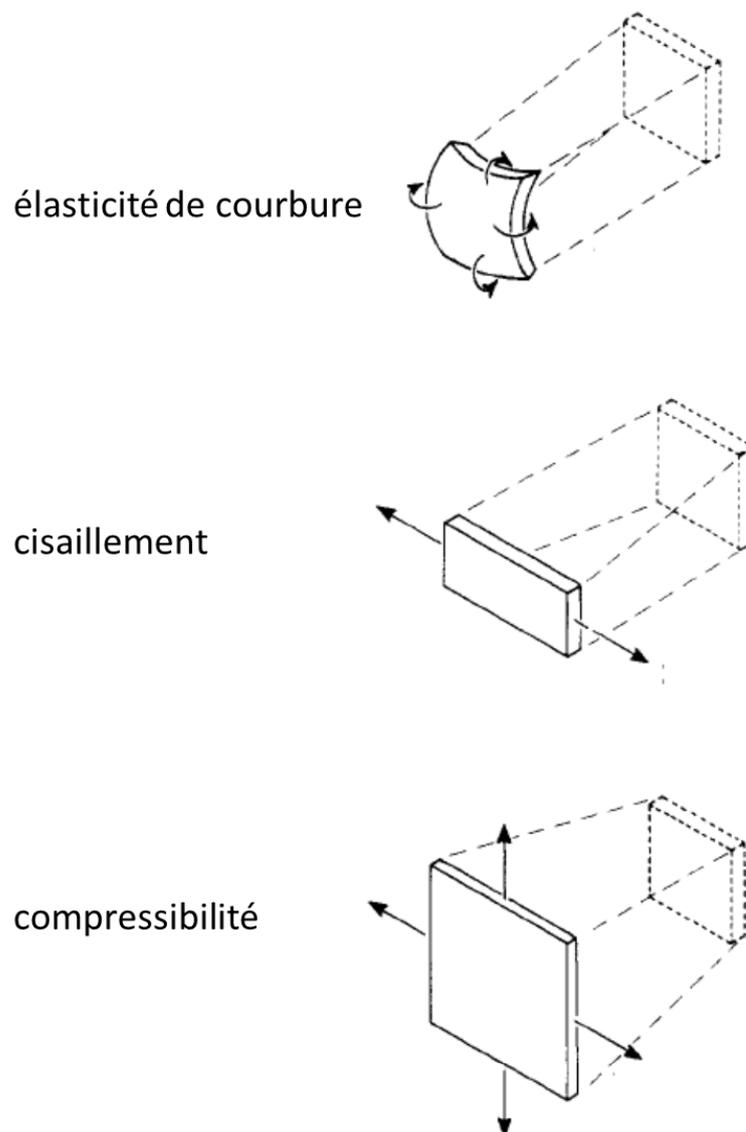


Figure I.18 : Trois modes de déformation indépendantes et résultantes des forces et des moments. L'élasticité de courbure, le cisaillement et la compressibilité de la membrane. Image adapté de (Evans 1987).

Les propriétés des lipides, de leurs têtes polaires et de leurs chaînes hydrophobes favorisent des **courbures** différentes de la membrane. Comme résultat de l'effet hydrophobe, une tension latérale interne est présente dans la membrane plasmique (la raison pour laquelle les bicouches lipidiques s'auto-réparent de leurs déformations) (Sackmann 1994).

Pourtant, la déformation dans un milieu donné ne se passe pas de manière spontanée ; il faut toujours une énergie minimale pour la provoquer, qui est introduite comme une courbure spontanée qui va impliquer un moment de courbure. Cette énergie associée peut dériver par exemple d'un gradient ou d'interactions entre différentes molécules. Cela peut se passer par exemple par insertion des protéines ou par modification de la densité de charge (comme par exemple la liaison d'ions Ca^{2+}) (Sackmann 1994; Graham and Kozlov 2010; Callan-Jones, Sorre *et al.* 2011).

Les molécules impliquées dans le changement de courbure de la membrane sont nombreuses et dans la plupart des cas très sélectives (Pucadyil and Schmid 2009), mais les mécanismes mis en jeu diffèrent peu. En revanche, les origines de la courbure membranaire peuvent être classées en cinq catégories (McMahon and Gallop 2005) : la première est le changement de composition lipidique (redistribution latérale - domaines ou transverse, flip-flop, changements de phase) qui, lui – même, peut être généré par le changement de température ou l'interaction avec d'autres molécules, comme par exemple l'hydrolyse de certains lipides (Farge and Devaux 1992; Farsad and De Camilli 2003). La deuxième est l'influence des protéines transmembranaires, comme leur agrégation (Eckler, Kuehn *et al.* 2005). Une troisième raison peut être l'assemblage des réseaux du cytosquelette, comme l'action des filaments d'actine. Un autre mécanisme consiste en la formation donc d'un squelette rigide de protéines extrinsèques qui va de son côté soit déformer la membrane soit stabiliser une membrane déjà courbée (Barelli and Antony 2009). Enfin, un cinquième mécanisme est l'insertion de parties de molécules amphiphiles (par exemple des domaines des protéines) dans l'un des deux feuilletts de la bicouche lipidique, provoquant la courbure de la membrane en augmentant l'asymétrie de surface entre les deux feuilletts (Ford, Mills *et al.* 2002; Barelli and Antony 2009; Prinz and Hinshaw 2009).

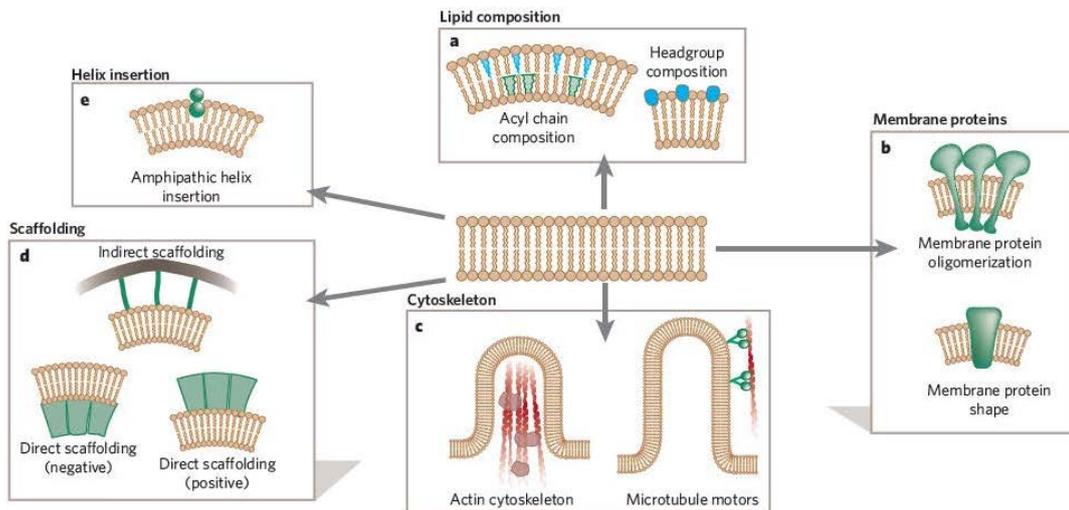


Figure I.19 : Les différents mécanismes qui peuvent provoquer le changement de courbure de la membrane. Tiré de (McMahon and Gallop 2005).

Le **cisaillement** de la membrane peut être représenté comme l'étirement d'une longueur δL d'une bicouche carrée et sa compression de même longueur selon la direction perpendiculaire (figure I.18). La **compressibilité** de la bicouche est liée à sa résistance à une tension isotrope (compression ou dilatation). Cette résistance est caractérisée par une énergie élastique par unité de surface, liée au taux de la tension nécessaire pour maintenir le changement d'aire.

I.3.b. Bourgeonnement membranaire

Le bourgeonnement de la membrane (membrane « budding ») est aussi un des processus fondamentaux pour la vie, le fonctionnement et la mort de la cellule. Il est impliqué dans le transport vésiculaire et la biogenèse multivésiculaire, donc dans des fonctions cruciales à comprendre, puisque plusieurs virus, comme le HIV – 1, utilisent ce mécanisme (Meiser, Sancho *et al.* 2003; Hurley, Boura *et al.* 2010). Il s'agit d'une étape impliquée dans tous les processus du trafic vésiculaire, étant donné que le bourgeonnement de la membrane « donneuse » est nécessaire pour la création de la vésicule qui va ensuite être transportée et fusionner avec la membrane « accepteuse ».

Son mécanisme implique des protéines dans un premier temps, mais les acteurs principaux

peuvent aussi être des lipides et leur dynamique (figure I.20). En revanche, même dans les cas où les protéines jouent le rôle principal, il est important d'étudier le rôle des lipides et comment ils peuvent minimiser l'énergie nécessaire pour sa réalisation. La courbure de la membrane est, là encore, très importante.

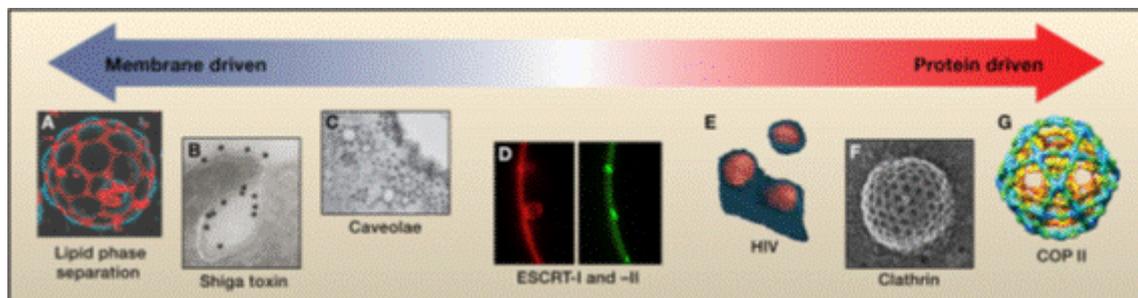


Figure I.20 : Le bourgeonnement de la membrane peut être dû principalement à des protéines ou aux lipides. Voici quelques exemples (figure tirée de (Hurley, Boura *et al.* 2010)) : **A.** Bourgeonnement (en l'absence totale de protéine) des microdomaines lipidiques dans des *GUV* fabriquées à partir de lipides synthétiques. **B.** Exemple d'un bourgeonnement dont les acteurs principaux sont les lipides, mais qui est provoqué par une protéine, la toxine shiga (points noirs). **C.** Le bourgeonnement induit par des *caveolae*, mécanisme impliquant l'existence de microdomaines et un "manteau" protéique. **D.** Bourgeonnement de *GUV* synthétiques induit par les protéines ESCRT-I et -II. Ces structures sont organisées par les protéines, mais sans structuration en "manteau", laissant penser que des microdomaines sont impliqués. **E.** Bourgeonnements induits par la capsid protéique de HIV – 1. **F.** Des puits recouverts de clathrine. Les assemblages de clathrine en dehors de la membrane sont trop flexibles et le rôle d'autres protéines membranaires ou/et des lipides est supposé pour expliquer le bourgeonnement. **G.** Le cage de COP II (« *coated protein* ») un exemple d'une structure protéique qui peut être formée en absence des lipides et qui peut imposer sa forme à de nombreux mélange de lipides en monocouche.

La formation des vésicules à partir d'une membrane plane nécessite une grande quantité d'énergie libre pour provoquer la courbure (énergie nécessaire $\Delta G \sim 250-600 k_B T$ (avec k_B constante de Boltzmann) (Bloom, Evans *et al.* 1991), alors que les événements qui nécessitent plus de $100 k_B T$ d'énergie ne peuvent pas avoir lieu spontanément) (Hurley, Boura *et al.* 2010). Donc, la question est de savoir comment les interactions entre protéines et lipides et entre les lipides vont fournir l'énergie nécessaire.

L'action des protéines implique la formation des vésicules recouvertes. L'exemple de bourgeonnement impliquant des protéines le plus étudié est la formation des vésicules recouvertes de Clathrine (*Clathrin Coated Vesicles* - CCV). Les CCV font 60 à 100 nm de diamètre (Ungewickell and Hinrichsen 2007; Pucadyil and Schmid 2009). Ici encore, des lipides comme le cholestérol ont un rôle important à jouer. (Hurley, Boura *et al.* 2010)

Les *GUV* ont permis de mettre en évidence le bourgeonnement dans des systèmes purement lipidiques (Farge and Devaux 1992; Baumgart, Hess *et al.* 2003). Par les

méthodes différentes utilisées pour le provoquer, le bourgeonnement semble être toujours conséquence du changement sur le ratio entre le volume et la surface des lipides, comme par exemple de l'ajout des lipides sur un de deux feuilletts ou de modification de la pression osmotique (Farge and Devaux 1992; Mathivet, Cribier *et al.* 1996; Papadopoulos, Vehring *et al.* 2007). Dans un autre cas, la tension de ligne, provoquée par le contact des parties hydrophobes des lipides qui se trouvent en phase L_o avec les têtes polaires hydrophiles des lipides en phase L_d , conduit à la « sortie » d'une partie de la bicouche du plan de la membrane et si la tension de ligne est très importante, la « liaison » des deux plans peut être coupée. Ainsi, la formation de domaines dans la membrane lipidique peut aussi conduire au bourgeonnement de la membrane et même indiquer sa direction (Lipowsky 1993; Bacia, Schwille *et al.* 2005). Il s'agit encore des mécanismes observés dans des GUV et non dans des membranes biologiques, ce qui ne paraît pas si contradictoire, puisque dans la cellule des mécanismes de régulation de la taille des domaines doivent exister.

I.4. La déstabilisation de la bicouche lipidique – facteur de communication avec son environnement

La vie et plus particulièrement la vie de la cellule est loin d'être quelque chose de statique. Pour que la cellule fonctionne, elle a besoin d'interagir avec différentes molécules, de communiquer avec d'autres cellules, d'importer ou d'exporter différentes substances, de changer sa forme et de s'adapter à chaque instant à la fonction qui y a lieu. Dans ce cadre – là, il est évident que les membranes (il s'agit ici des cellules eucaryotes) ont un rôle crucial à jouer. Étant donné que la membrane plasmique est la barrière qui délimite la cellule, l'étude de sa dynamique devient un sujet très important. Dans cette partie, l'importance des propriétés mécaniques et physicochimiques mentionnées auparavant va devenir encore plus claire en ce qui concerne la dynamique de la cellule.

I.4.a. La perméabilité de la membrane

Dans la « vie quotidienne » de la cellule, il y a des molécules qui peuvent traverser sa membrane en permanence. Les petites molécules sans charge, comme par exemple le O_2 , le CO_2 , les acides gras ou l'éthanol, peuvent diffuser facilement lorsque leur concentration varie entre les deux milieux intracellulaire et extracellulaire, alors que des molécules chargées, comme les ions et les métabolites ne le peuvent pas. Il y a donc une perméabilité sélective (figure I.21) de la membrane qui lui permet de maintenir les concentrations des milieux intracellulaire et extracellulaire et de garantir que les fonctions vitales puissent avoir lieu.

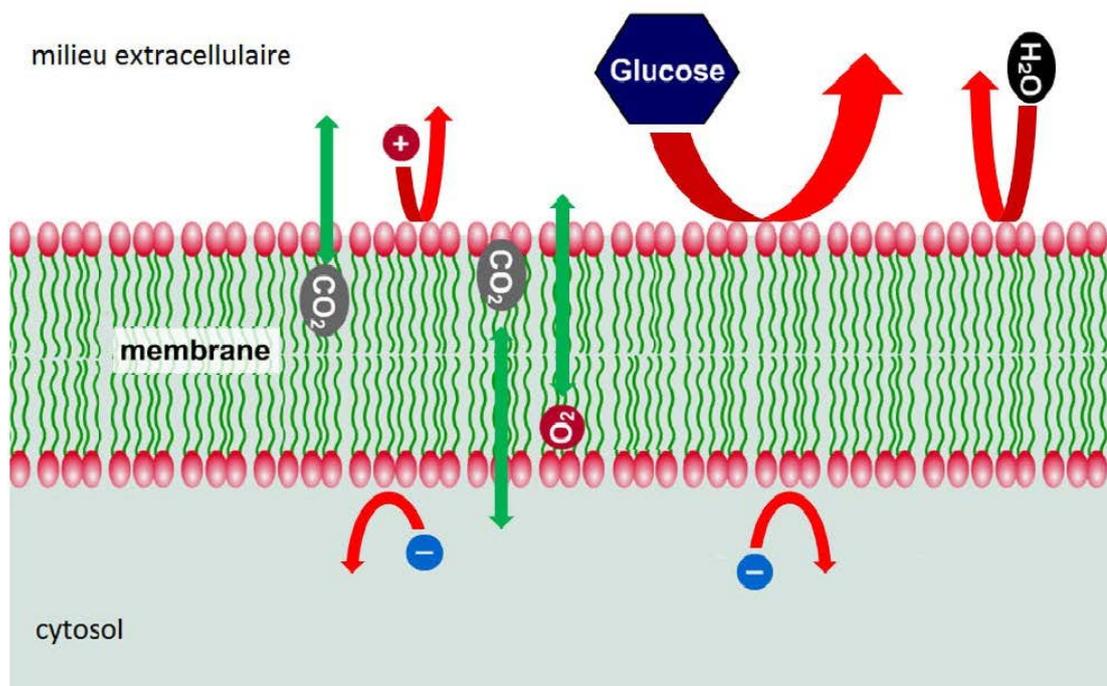


Figure I.21 : La perméabilité sélective de la membrane plasmique. Les petites molécules sans charge peuvent diffuser facilement, alors que des molécules hydrophiles, comme les ions et les métabolites ne le peuvent pas.

En revanche, pour que des molécules qui *a priori* ne peuvent pas traverser la membrane le fassent quand il y a besoin, il existe des mécanismes qui permettent aux molécules de passer d'un milieu à l'autre. Les protéines canaux ou transporteurs remplissent ce rôle en ce qui concerne les ions et autres petites molécules, et le transport vésiculaire l'assure pour les plus grosses molécules.

Comme déjà mentionné auparavant, le transport à travers la membrane cellulaire peut être passif ou actif. Pour les deux, ce sont les protéines de la membrane qui assurent ce mécanisme et jouent le rôle du « conduit » pour que les molécules traversent la barrière hydrophobe de la membrane. Le transport passif (ou facilité) a lieu grâce aux protéines appelées canaux, qui sont des protéines transmembranaires dont le fonctionnement ne dépend pas de l'ATP. Le transport se fait selon les lois de la diffusion et grâce au gradient électrochimique. Le transport actif est assuré par des protéines appelées protéines de transport. Elles sont, de manière générale, assez sélectives en ce qui concerne les molécules qui les traversent et c'est le couplage du transport à une réaction enzymatique exergonique, comme l'hydrolyse de l'ATP qui va assurer le transport, quand il s'agit d'un transport contre le gradient du potentiel membranaire. Dans la plupart des cas, les protéines de transport ont deux états : un état ouvert – qui laisse donc les molécules passer – et un état fermé. Elles basculent entre les deux conformations par différents *stimuli*, comme l'intervention d'un ligand. Différents types de transporteurs sont distingués, selon le nombre de molécules qu'ils laissent passer et les directions dans lesquelles ils le font.

LES 4 TYPES DE TRANSPORTS MEMBRANAIRES

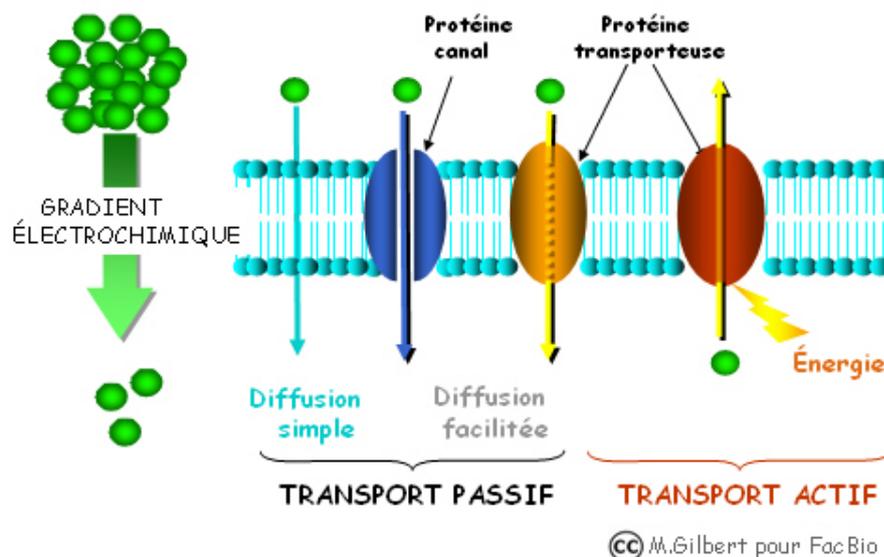


Figure I.22 : Les différents types de transport à travers la membrane plasmique.

Le transport vésiculaire consiste en l'encapsulation des molécules à transporter dans des vésicules lipidiques et la libération de leur contenu à l'endroit approprié. Par exemple, la bicouche des vésicules lipidiques fusionne avec la membrane plasmique, afin de libérer son

contenu dans le milieu extracellulaire (exocytose), ou « rompt » la membrane pour transporter des substances extracellulaires dans le cytosol (endocytose), comme montré figure 1.23. Les deux mécanismes dépendent de l'énergie. Les molécules qui sont transportées de cette manière sont des macromolécules chargées et trop grandes pour traverser la membrane via les canaux ou les transporteurs, comme par exemple des acides nucléiques, des peptides ou des protéines.

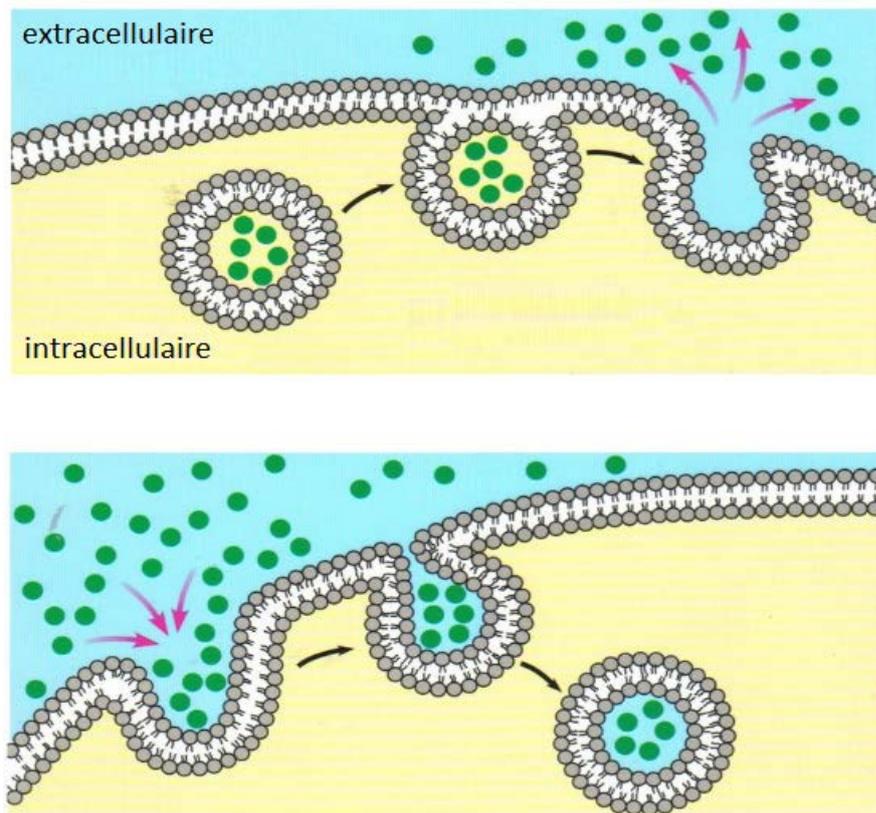


Figure 1.23 : Représentation schématique de l'exocytose (en haut) et de l'endocytose (en bas).

Les mécanismes décrits montrent encore plus l'importance de la membrane et de ses composants pour la vie et le développement - et même la mort ! - de la cellule. Il devient clair que pour que des déformations comme le bourgeonnement, la fusion et la fission membranaire et la perméabilisation (sélective ou pas) de la membrane puissent être effectués, elle doit pouvoir s'y adapter. Ces propriétés importantes de la membrane, sont aussi nécessaires pour d'autres processus non abordés ici, comme la reconnaissance entre cellules, le transport dans une cellule et même son apoptose.

Les contraintes physiques, l'environnement et la composition chimique sont tous importants pour de tels phénomènes de déformation et de perturbation membranaire. À

n'importe quel instant où la membrane est hors d'équilibre à cause d'un changement d'environnement ou de la présence d'une molécule, la minimisation d'énergie est encore une fois la clef pour tout changement. Des paramètres cruciaux pour la membrane sont sa courbure, son épaisseur, la présence d'interstices hydrophobes, les interactions électrostatiques (Siegel 1993).

1.4.b. La fusion et la fission membranaire

La fusion et la fission membranaires, déjà évoquées dans le paragraphe précédent, constituent des événements cellulaires vitaux et des processus fondamentaux du trafic intracellulaire et extracellulaire.

- **La fusion**

La fusion membranaire induit la réunion de deux membranes lipidiques en une seule membrane continue. Il s'agit d'un processus universel qui peut varier en ce qui concerne l'espace (aire de contact ~ 10000 – fois plus grande pour la fusion des organelles de l'ordre du micromètre (μm) comme les vacuoles que pour l'exocytose des vésicules synaptiques) et le temps (de l'ordre de la milliseconde pour des vésicules synaptiques à l'ordre de la minute pour les vacuoles) (Galli, Martinez-Arca *et al.* 2002; Jahn, Lang *et al.* 2003).

La fusion des membranes biologiques est majoritairement contrôlée par des protéines. Plusieurs protéines peuvent jouer un rôle pendant le processus de la fusion membranaire – ou des complexes protéiques, les plus importants étant les SNARE (Sollner, Whiteheart *et al.* 1993; Kümmel, Krishnakumar *et al.* 2011; Li, Pincet *et al.* 2011; Shi, Shen *et al.* 2012). Tout de même à des systèmes - modèles, la fusion a aussi été observée sous des conditions expérimentales appropriées (Alpadi, Kulkarni *et al.* 2012), en soulignant l'importance de la composition lipidique (Kasson and Pande 2007).

Malgré la diversité des mécanismes et des types de fusion, la fusion membranaire inclut toujours 3 étapes, le contact de deux membranes, leurs « mélange » (hémifusion) et l'ouverture d'un pore de fusion (Siegel 1993; Jahn, Lang *et al.* 2003). Par la suite, si ce pore ne se referme pas, il grandit et conduit à une seule structure membranaire. Les membranes s'approchent, surmontent les forces électrostatiques répulsives pour que ses lipides

puissent interagir entre eux et les limites entre les parties hydrophobes et hydrophiles de deux structures sont perturbées et déstabilisées (figure I.24). Pendant cette étape, des structures de transition, autres que la bicouche, peuvent être rencontrées et elles conduisent à la formation d'un pore, dit pore de fusion. Les forces qui entraînent les étapes de transition sont des forces appliquées pour que l'exposition des parties hydrophobes à l'environnement aqueux soient minimisée (Kuzmin, Zimmerberg *et al.* 2001).

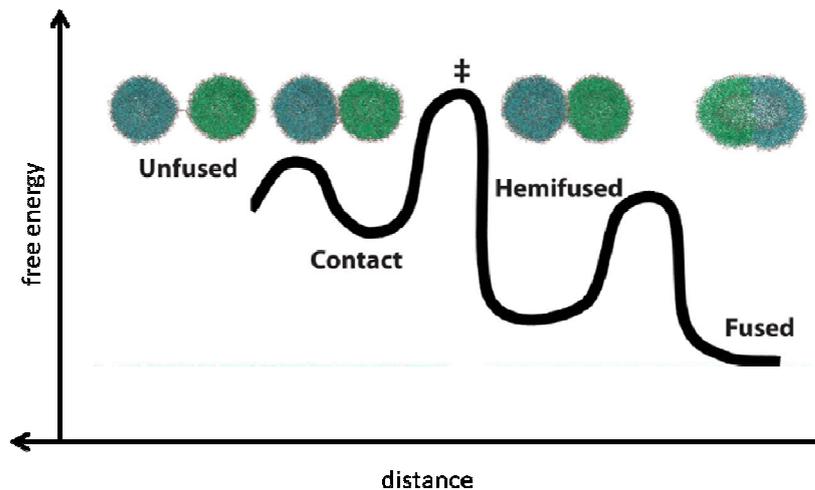


Figure I.24 : Les changements en énergie libre pendant la fusion membranaire de deux vésicules en fonction de la distance entre les deux membranes. Diagramme tiré de (Kasson, Lindahl *et al.* 2010) et basé sur des simulations à résolution atomique.

Pendant la fusion membranaire il y a des discontinuités physiques, la membrane est perturbée, sa courbure change et elle se plie. Les états transitoires désordonnés peuvent être stabilisés par les fluctuations et le mouvement thermique des lipides. Le pore créé constitue un pont aqueux reliant l'intérieur de deux structures et selon les données sur la fusion virale et l'exocytose, il peut avoir un diamètre de ~ 2 nm (Jahn, Lang *et al.* 2003).

La fusion membranaire constitue un phénomène finement contrôlé.

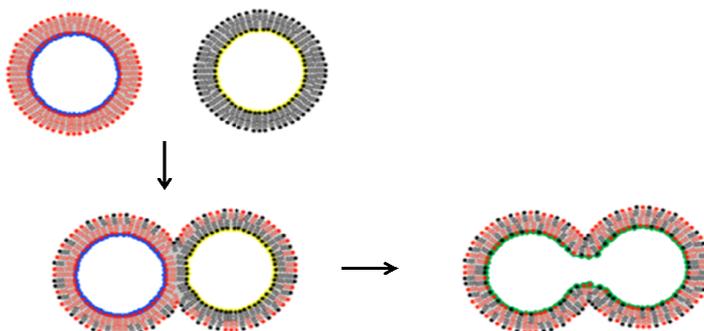


Figure I.25 : Représentation schématique des étapes de la fusion membranaire.

- La fission

La fission membranaire est le processus pendant lequel une vésicule se sépare d'une bicouche lipidique, sans modifier l'intégrité du « donneur ». Trois principales étapes peuvent être distinguées concernant la formation de ces vésicules de transport : la ségrégation de la cargaison par le compartiment « donneur », la génération de la courbure et du bourgeonnement de la membrane selon la taille de la cargaison et la séparation du « donneur » par fission membranaire (Campelo and Malhotra 2012).

Il est connu que des protéines sont nécessaires pour que la fission membranaire ait lieu, la GTPase dynamine étant la plus étudiée (Roux and Antonny 2008). D'autres protéines bien caractérisées sont impliquées dans le processus (les protéines G de la famille Arf, les domaines BAR et la protéine kinase D). Même si le mécanisme d'action de chacune de ces protéines semblent être différent, elles ont toutes la capacité de s'insérer dans la membrane et de s'oligomériser afin de provoquer des courbures importantes (Campelo and Malhotra 2012). Indépendamment du mécanisme concret à chaque fois, il est sûr que la tension de la membrane est encore une fois une des clefs du processus.

La fission commence par la création d'un petit cou qui va ensuite devenir encore plus étroit de manière que les deux monocouches qui se trouvent en face au niveau du cou fusionnent en créant un intermédiaire pour se décrocher finalement de la membrane sans que le compartiment – mère soit exposé à l'environnement extérieur (figure I.26).

Du point de vue énergétique, la barrière qui doit être surmontée pour la formation de l'état intermédiaire de fission est surmontée par l'énergie des fluctuations thermiques et a été évaluée (en utilisant les données sur l'échelle de temps de sa formation) à environ $40 k_B T$. Une fois l'état intermédiaire formé, le reste du processus se passe de manière spontanée (Kuzmin, Zimmerberg *et al.* 2001; Campelo and Malhotra 2012).

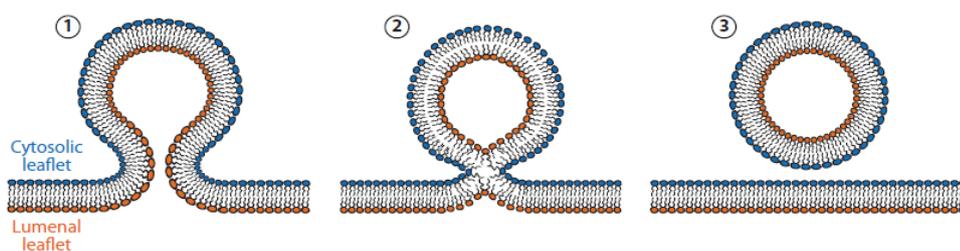


Figure I.26 : Les trois grandes étapes de la fission membranaire. Image tirée de (Campelo and Malhotra 2012).

II. La perméabilisation membranaire

Comme nous l'avons déjà mentionné plusieurs fois, la membrane constitue une barrière hydrophobe délimitant la cellule. Cependant, elle ne doit pas être affranchissable. La création d'une ou de plusieurs structures de perméation transitoires permet de franchir cette barrière : la membrane est alors perméabilisée. La cellule possède de tels mécanismes (par elle – même ou en interaction avec d'autres partenaires) pour son fonctionnement, et il est possible d'en induire d'autres artificiellement.

Il existe plusieurs mécanismes intrinsèques de perméabilisation de la membrane plasmique, comme l'ouverture des canaux membranaires ou la modification de l'état de la structure de la membrane par l'action de molécules intrinsèques. Ces processus peuvent correspondre à des fonctions vitales ou à des situations pathologiques, comme l'infection par un virus.

Parfois il y a besoin que nous intervenions pour des raisons thérapeutiques sur le fonctionnement et la vie des cellules, comme l'introduction de médicaments. Plusieurs molécules sont connues pour leur capacité de perturber et de perméabiliser la membrane. Un type de ces molécules sont les peptides antimicrobiens (ou lytiques), qui seront développés au paragraphe II.1.b.

II.1. L'importance de la perméabilisation membranaire

À des fins thérapeutiques ou de diagnostic, il est important de pouvoir agir directement au niveau cellulaire et de faire rentrer des médicaments en ciblant des cellules. Cela permet d'augmenter l'efficacité des médicaments en augmentant leur concentration au niveau du site d'interaction en évitant d'autres sites éventuellement non ciblés ou d'attaquer des cellules, comme dans le cas des cellules tumorales (Tamzali, Borde *et al.* 2012). Il s'agit d'un domaine qui se développe de manière continue durant les dernières années, grâce - entre autres - au progrès fait au niveau des nanotechnologies. Une piste explorée est l'utilisation de liposomes encapsulant des molécules à visée thérapeutique, appelés des nanomédicaments liposomales (Liposomal Nanomedicines - LN).

En effet, les propriétés mécaniques et physico-chimiques des vésicules en font un objet particulièrement adapté à des fins thérapeutiques et largement utilisé. Plus concrètement, des liposomes chargés avec le médicament sont produits et envoyés vers des cellules – cibles. Cet usage est tout à fait approprié, puisque pour que le transporteur des médicaments soient des bons agents, il faut une taille petite (<100 nm), un remplissage facile avec les molécules souhaitées, une stabilité importante pour avoir le temps d'atteindre les cellules – cibles) et des propriétés fusogéniques ou de fuite de leur milieu interne. (Allen 1994). Selon les situations, les molécules encapsulées dans les liposomes sont destinées à être libérées dans la cellule ou l'organelle après fusion du liposome avec la bicouche lipidique, ou fuir par les LN au voisinage et être prises par les cellules ou organelles – cibles (Cullis 1998; Fenske, Chonn *et al.* 2008) (Figure II.1).

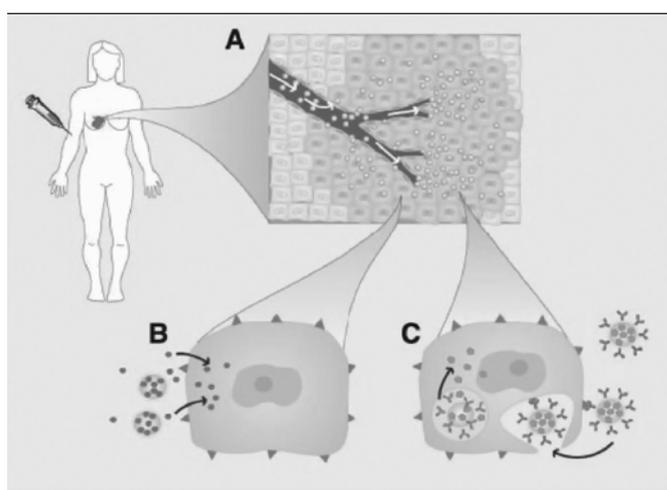


Figure II.1 : Les liposomes peuvent être utilisés pour le transport des molécules dans les cellules, soit pour qu'ils fusionnent avec la membrane de la cible et qu'ils libèrent les molécules transportées à l'intérieur, soit pour fuir et libérer les molécules qui vont après rentrer à l'endroit approprié (Fenske, Chonn *et al.* 2008).

De nos jours, ce champ d'étude a fait des progrès très importants et les LN pourraient être utilisées, outre leur utilisation pour de petits médicaments, pour des médicaments géniques (thérapie des gènes, agents d'extinction d'expression de gènes). Plusieurs paramètres sont connus pour avoir un effet sur l'efficacité de tels systèmes, comme par exemple la composition lipidique et la charge, le ratio médicament / lipides, la taille de la vésicule, le rendement d'encapsulation, la stabilité de la vésicule jusqu'à sa cellule-cible et sa capacité à relarguer son contenu. Pendant cette recherche plusieurs éléments sur l'administration de médicaments ont été clarifiés. La pharmacocinétique étant un de ces éléments, il a été montré que les PEG (polyéthylène glycols) peuvent être la clef afin d'améliorer cette utilisation de LN, étant donné que leur présence augmente la stabilisation de la bicouche, en lui permettant d'accéder à des cibles plus éloignées. Le mécanisme

proposé suggère que les chaînes des polymères flexibles et hydrophiles sont greffées sur la surface et forment des « nuages de protection » autour des liposomes, en empêchant ainsi l'interaction de leur surface avec d'autres macromolécules (Torchilin and Trubetskoy 1995; Chrai 2002). D'autres partenaires ont été récemment proposés, comme des polymères zwitterioniques et superhydrophiles, afin d'éviter des effets non désirables de PEG (Cao, Zhang *et al.* 2012).

Au cours des dernières années, d'autres transporteurs de médicaments ont été développés, comme les nanotubes de carbone fonctionnalisés (Benincasa, Pacor *et al.* 2011), capables de transporter des agents thérapeutiques avec des signaux optiques pour l'imagerie, une capacité de reconnaissance et/ou de ciblage spécifique.

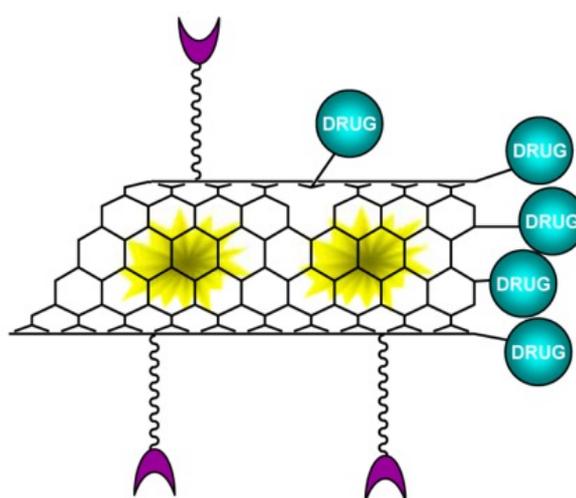


Figure II.2 : Nanotubes de carbone multi-fonctionnalisés avec une molécule d'intérêt thérapeutique (bleu), un agent de ciblage (violet) et une sonde pour l'imagerie (jaune). Figure tirée par le site web de l'équipe CNRS UPR 9021.

Les propriétés pharmacocinétiques, la biodistribution des médicaments et le transport (basé sur la structure hydrophobe/hydrophile) des molécules peuvent être prévus en grand partie, grâce à l'étude des interactions lipides – médicaments (Peetla, Stine *et al.* 2009). Les propriétés de la membrane lipidique interviennent à tous les étapes de l'administration des médicaments : encapsulation, stabilité, ciblage, libération ; ce qui justifie, si besoin, l'intérêt de leur étude, ainsi que l'étude de la perméabilisation membranaire.

II.1.a. Différentes approches de perméabilisation membranaire

Afin de perméabiliser les membranes modèles ou des cellules *in vitro* plusieurs méthodes physicochimiques peuvent être utilisées, comme les détergents, des peptides antimicrobiens, l'électroporation ou la microinjection.

- **Les détergents**

Les détergents, sont des molécules capables de solubiliser les membranes lipidiques. Cela est lié à leur caractère tensioactif (capacité de modifier la tension superficielle). En effet, en présence des détergents, des perturbations à la bicouche lipidique sont observées qui vont de simples modifications morphologiques, jusqu'à la solubilisation rapide de la membrane. La solubilisation de la membrane implique plusieurs états intermédiaires. Le mécanisme de solubilisation dépend de la nature du détergent, de sa concentration et de la composition membranaire. Les intermédiaires qui peuvent être détectés ont des formes diverses : des micelles, des cylindres ou des fragments membranaires (Kragh-Hansen, le Maire *et al.* 1998). De manière générale, la solubilisation fait passer la bicouche d'un état d'équilibre à un système biphasique de lipides, de tensioactifs et d'eau (Almgren 2000). À l'état final des micelles mixtes de détergents et de lipides sont présentes.

- **Peptides antimicrobiens**

Face à la résistance des pathogènes (bactéries, champignons, virus) aux antibiotiques conventionnels, les peptides antimicrobiens, sont devenus un champ de recherche très développé ces dernières années. Il s'agit des peptides à caractère amphiphile, dont le type d'interaction avec la membrane plasmique ressemble à celles des molécules tensioactives. Ils ont la capacité de former des pores, de lyser la membrane des pathogènes et, par conséquent, présentent des activités antibiotiques (Bechinger and Lohner 2006).

Les peptides endogènes antimicrobiens sont principalement synthétisés dans les kératinocytes, les cellules épithéliales et les lymphocytes des organismes supérieurs, où ils sont accumulés dans des granules et des vésicules et ils peuvent être libérés très vite. Dans certains cas, ils ne sont synthétisés qu'après induction. Ils jouent un rôle essentiel dans les étapes initiales de l'élimination des pathogènes (Huang 2000).

De très nombreux peptides ont été étudiés (près de 2000 peptides naturels ont ainsi été mis en évidence) (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Parmi les peptides les plus étudiés se trouve certainement la mélittine, qui provient du venin des abeilles et qui, selon les études, crée ou non des pores (il a même été publié qu'elle empêchait la formation de pores) selon sa conformation - parallèle ou perpendiculaire à la membrane (van den Bogaart, Guzman *et al.* 2008).

La manière dont ces molécules perméabilisent la membrane n'est pas tout à fait comprise ; quatre modèles au moins sont proposés dans la littérature (Chan, Prenner *et al.* 2006; Chang, Wimley *et al.* 2008). Les modèles les plus souvent rencontrés sont : i) le modèle « pore toroïdal » (des forces électrostatiques favorisent l'interaction des parties polaires des peptides avec la surface de la membrane, l'insertion du peptide à l'interface provoque la distorsion des lipides et un stress membranaire conduit à la formation d'un pore toroïdal) (Garcia-Saez, Chiantia *et al.* 2007), ii) le modèle « tonneau » (les peptides en hélices α s'agrègent à la membrane, puis s'insèrent dans le cœur hydrophobe de la bicouche et recrutent davantage de monomères, augmentant ainsi la taille du pore) (Porcelli, Buck *et al.* 2004) et iii) le modèle de « tapis » (les peptides s'accumulent sur la membrane et la déstabilisation provoquée conduit à la micellisation de celle-ci) (Rausch, Marks *et al.* 2007). Les trois modèles sont indiqués figure II.3. Un quatrième modèle proposé, parfois non distingué du modèle de « tapis » (Sato and Feix 2006), est le modèle appelé « effet détergent ». L'élément intéressant de ce modèle est l'hypothèse de l'agrégation des peptides en micelles, ce qui va affecter l'influence de la concentration.

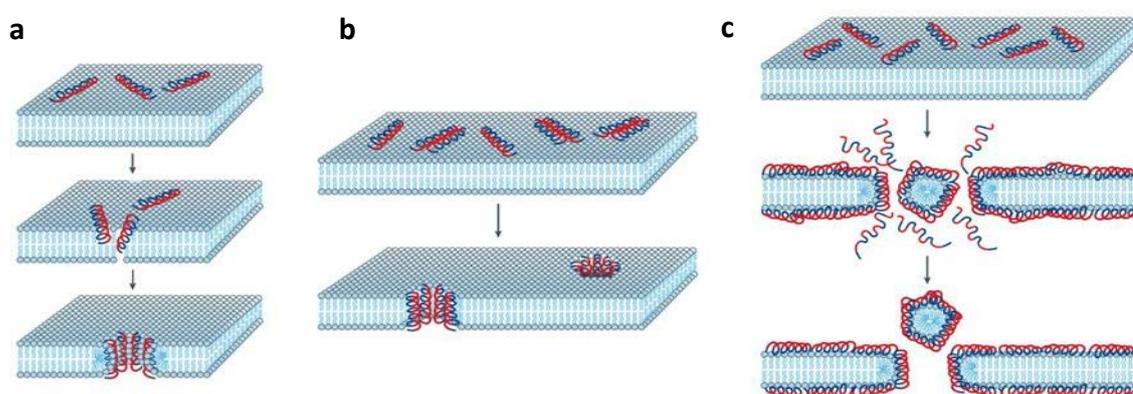


Figure II.3 : Représentation schématique des différents modèles proposés pour la perméabilisation de la membrane par des peptides : a. le modèle toroïdal, b. le modèle tonneau et c. le modèles de tapis. Les parties hydrophobes sont représentées en bleu et les parties hydrophiles en rouge. Figures tirés de (Brogden 2005).

Différents paramètres ont été proposés comme des facteurs importants pour la perméabilisation de la membrane, comme le ratio P/L (peptides/lipides) (Huang 2000), la température et la composition lipidique de la membrane (Hasper, de Kruijff *et al.* 2004; Wiedemann, Benz *et al.* 2004).

- **Electroporation :**

L'application d'un champ électrique externe à la membrane conduit à la modification de ses propriétés et à sa perméabilisation pour des valeurs au-dessus d'une valeur critique. Ce champ électrique peut aussi être provoqué par l'accumulation des peptides chargés sur la surface de la membrane (Bechinger and Lohner 2006).

Il s'agit d'une méthode largement utilisée, par exemple pour introduire de l'ADN (Golzio, Escoffre *et al.* 2010) ou des composées polaires (Teissie, Escoffre *et al.* 2012) dans les cellules. Récemment, une thérapie contre le cancer utilisant des impulsions électriques afin d'augmenter la perméabilité des membranes à des médicaments hydrophiles a été proposée (Tamzali, Borde *et al.* 2012). Le principe de l'électroporation est l'application d'un champ électrique sur la membrane qui la déstabilise et la molécule migre vers le pôle positif.

- **Microinjection :**

Il s'agit de l'insertion de petits volumes dans un tissu biologique ou dans une cellule en utilisant une micropipette. Elle est souvent utilisée comme méthode pour l'injection d'ADN d'autres molécules directement dans des cellules (Evans 2006).

II.2. Perméabilisation de la membrane avec des polymères amphiphiles

Comme il est clair, diverses méthodes pour la perméabilisation membranaire sont développées, quelques-unes parmi elles ayant été décrites au paragraphe précédent. En revanche, jusqu'à maintenant aucune méthode bien contrôlable permettant d'éviter d'autres effets indésirables, n'a encore été trouvée. Le contrôle des mécanismes qui peuvent déclencher l'ouverture de la membrane par l'utilisation de *stimuli* externes, comme la chaleur (Gao, Han *et al.* 2012) ou la lumière (Kocer, Walko *et al.* 2005; Bayley 2006; Hou, Gilbert *et al.* 2011; Garrison, Dietrich *et al.* 2012) et leur utilisation dans ce but pourrait être une innovation marquante dans ce domaine. D'ailleurs, de tels stimuli pourraient aussi servir à contrôler la fuite des vésicules indépendamment de l'endroit où elles se trouvent ou de leur temps de circulation et leur capacité fusogénique ; des facteurs qui autrement auraient joué un rôle crucial, comme il a déjà été expliqué.

Les polymères sont des molécules qui trouvent toujours de nouvelles applications. Leur utilisation va de toutes les filières de la vie quotidienne, comme l'emballage et la vie domestique, jusqu'à des usages extrêmement sophistiqués, comme les nanotechnologies. En pharmacologie, les polymères sont utilisés afin d'améliorer des systèmes d'administration des médicaments (figure II.4) (Cullis 1998; Palmer, Chen *et al.* 2003; Peetla, Stine *et al.* 2009), par exemple pour augmenter leur stabilité et donc leur chance d'atteindre leur cible (Cullis 1998) ou pour développer des nouveaux biosenseurs (Tanaka and Sackmann 2005).

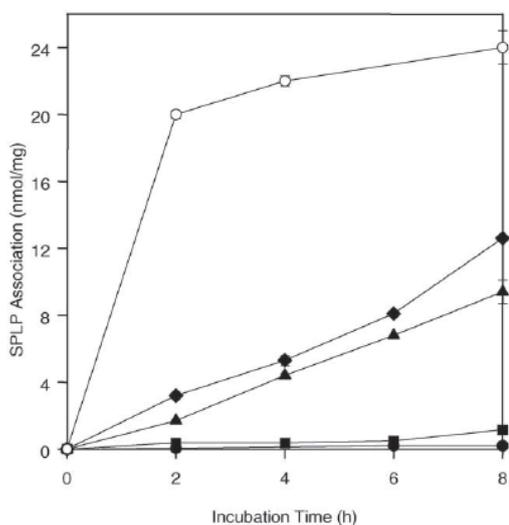


Figure II.4 : Modification du taux d'association des particules plasmide-lipides (« stabilized plasmid-lipid particles » - SPLP) par rapport à la quantité de polymère incorporé (cationic poly(ethylene glycol) lipid avec 4 charges positives - CPL₄) : 0 (●), 2 (■), 3 (▲), or 4 (◆) mol% CPL₄. Des résultats sans l'utilisation du polymère pour des structures lipidiques DOPE : DODAC sont montrés comme référence(○). Figure tirée du (Palmer, Chen *et al.* 2003).

II.2.a. Les polymères amphiphiles

Les Amphipols (Apols) sont des polymères amphiphiles, contenant donc des groupements hydrophiles et des groupements hydrophobes. Ils s'auto-assemblent en des structures globulaires compactes, similaires aux structures micellaires formées par les détergents. Ils présentent des propriétés tensioactives et ils sont utilisés comme tels dans des applications biochimiques, comme le maintien en solution aqueuse de protéines membranaires, qui a été leur première utilisation (Tribet, Audebert *et al.* 1996, Popot, Althoff *et al.* 2011). Des polymères hydrophiles ou contenant quelques ancrages hydrophobes sont connus pour leur effet stabilisateur sur les liposomes (Gabizon and Papahadjopoulos 1988, Fenske, Chonn *et al.* 2008, Wang, Marks *et al.* 2012), alors que des polymères possédant plus de groupements hydrophobes sont décrits comme déstabilisant la bicouche lipidique (Vial, Rabhi *et al.* 2005, Peetla, Stine *et al.* 2009) et/ou la perméabilisant (Wang, Marks *et al.* 2012). Bien sûr, la concentration du polymère est elle-même un facteur important qui peut « transformer » un polymère stabilisant la bicouche en un facteur de déstabilisation et donc de perméabilisation membranaire. En utilisant un type de polymères dont l'hydrophobicité a été modifiée (« *hydrophobically modified poly(acrylic acid)* » - HMPA), avec un rapport intermédiaire de groupements hydrophobes, il a été montré qu'il est possible de se placer à la limite de déstabilisation de la bicouche (Vial, Rabhi *et al.* 2005). En effet, des différentes HMPA, en conditions favorables, sont capables de perméabiliser la bicouche lipidique (structures de l'ordre de quelques nm) (figure II.5), à des concentrations très inférieures comparativement à celles nécessaires en détergent. Ceci n'est pas forcément suivi par la solubilisation de la bicouche (Vial, Rabhi *et al.* 2005).

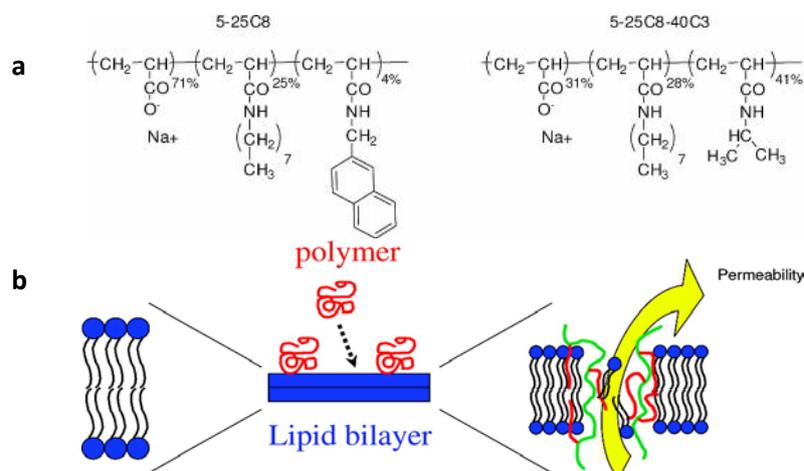


Figure II.5 : Différents HMPA **(a)** ont été étudié afin de conclure sur la perméabilisation de la bicouche lipidique **(b)** (Vial, Cousin *et al.* 2009). En rouge sont représentés les différents polymères et en vert le FITC – Dextrane.

Dans ce contexte, l'importance du taux d'hydrophobicité et des interactions électrostatiques est soulignée. Ce sont les interactions hydrophobes qui jouent le rôle – clef pour l'ancrage de ces polymères à la surface de la bicouche. Quand le taux d'hydrophobie est modéré, les HMPA peuvent perméabiliser la bicouche sans rupture complète. Les structures de perméation créées sont vues comme des pores bien définis et stabilisés par l'abaissement de la tension de ligne du bord du pore, ainsi que par la répulsion électrostatique entre les HMPA, latérales ou internes au pore (Ladavière, Tribet *et al.* 2002; Vial 2007; Vial, Oukhaled *et al.* 2007; Tribet and Vial 2008; Vial, Cousin *et al.* 2009).

II.2.b. Polymères modifiés Azobenzène (AMP) : le 15C8 10azo

Des polymères amphiphiles ont déjà été décrits comme pouvant transporter des gènes *in vivo* à travers la membrane (Uchegbu, Sadiq *et al.* 2004), le mécanisme proposé étant la formation de structures de perméation (Huin, Le Gall *et al.* 2011). L'utilisation donc des polymères dont l'hydrophobicité pourrait être modifiée de loin nous donnerait la possibilité de contrôler l'administration des molécules dans des cellules - cibles.

Une manière de moduler le taux d'hydrophobicité d'un HMPA est d'avoir un *stimulus* externe. Cela permettrait, outre le contrôle de la perméabilisation de la bicouche de l'extérieur, d'éviter des effets indésirables, puisqu'il s'agit d'une méthode non – invasive. Les polymères modifiés à l'azo-benzène (Azobenzene Modified Polymers - AMP), possèdent cette propriété. Ce sont des polymères HMPA sur lesquels sont greffées des molécules d'Azobenzène.

L'azobenzène est composé par deux cycles phényles liés par une double liaison azote – azote. Il peut prendre deux conformations, une conformation « pliée » (*cis*) et une conformation « dépliée » (*trans*), montrées figure II.6. Le basculement entre les deux conformations est provoqué par une illumination à la longueur d'onde adéquate (photo – isomérisation). L'isomérisation de *cis* en *trans* se passe par illumination en lumière UV, alors que l'isomérisation de *trans* en *cis* se passe en lumière bleue. La conformation *trans* de la molécule est plus stable que la conformation *cis* ($\Delta E=50$ kJ/mol) et la photoisomérisation correspond à ~ 200 kJ/mol. L'azobenzène relaxe donc spontanément en conformation *trans*.

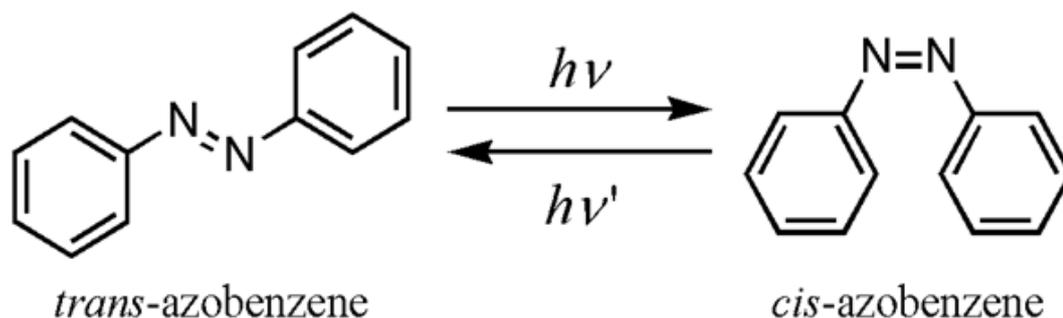


Figure II.6 : L'azobenzène possède deux conformations, une conformation *trans* et une conformation *cis*. Le basculement entre les deux se fait par photo – isomérisation.

L'azobenzène est utilisé dans différents domaines (cosmétique, alimentaire, industriel) (Chevallier, Monteux *et al.* 2012), mais aussi très souvent dans les sciences de la vie, à cause de cette propriété de photostimulation. Des vésicules lipidiques composées de lipides PC contenant des lipides synthétiques « Bis – Azo PC » ont été utilisées pour libérer leur contenu par étape en contrôlant la longueur d'onde d'irradiation (figure II.7.a) (Bisby, Mead *et al.* 2000). De la même façon, des dérivés du cholestérol sur lesquels étaient greffés des groupements d'Azobenzène, incorporés dans des vésicules encapsulant des sondes fluorescentes (calcéine) permettent le photo - contrôle du taux de libération de leur milieu intérieur (figure II.7.b) (Liu, Yang *et al.* 2005).

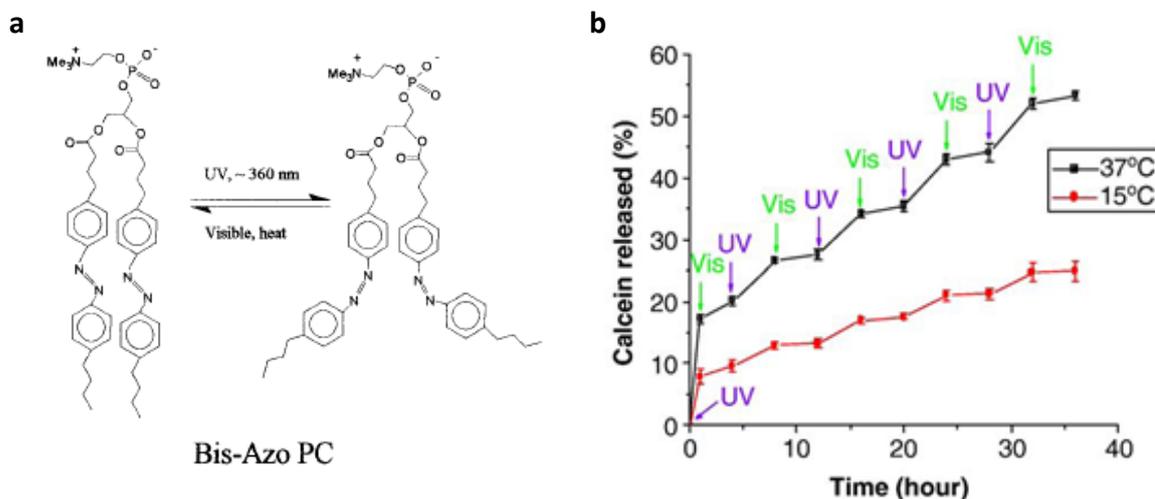


Figure II.7 : Des différentes expériences montrant l'effet de l'azobenzène : **a.** des liposomes fabriquées contenant des lipides photochromiques présentés à la figure ont été montrées à fuir quand elles sont en conformation favorable (Bisby, Mead *et al.* 2000) et **b.** des liposomes fabriquées en utilisant un dérivé du cholestérol contenant de l'azobenzène changent leur cinétique de fuite selon la longueur d'onde de la lumière envoyée (Liu, Yang *et al.* 2005).

Dans le cadre des travaux de cette thèse une telle molécule, le 15C₈ 10azo, a été étudiée. La synthèse de l'AMP utilisé, du 15C₈ 10azo, réalisée par l'équipe de Christophe Tribet (UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC), a été décrite de manière détaillée (Gohon, Giusti *et al.* 2006; Sebai, Cribier *et al.* 2010). Il s'agit d'un acide poly (acrylique) sur lequel 15% (mol) de groupes octyles et 10% (mol) de groupements azobenzène sont ancrés (figure II.8). Sa masse moléculaire est ~ 13,5 kDa.

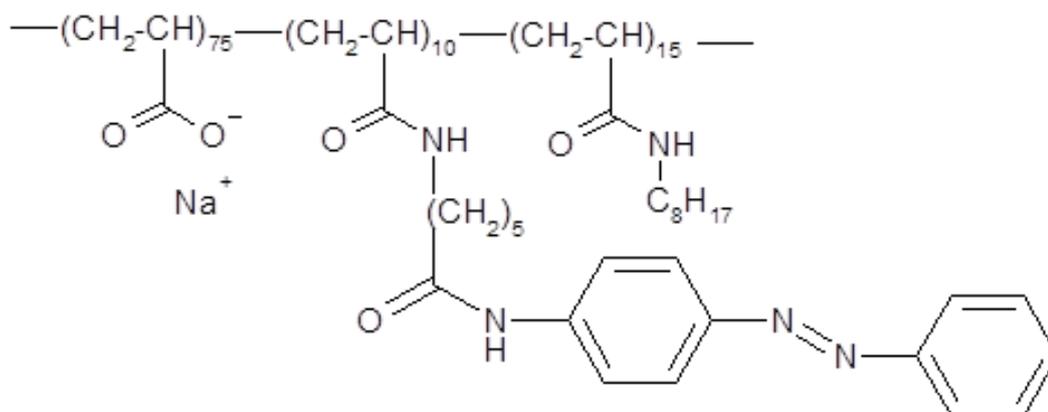


Figure II.8 : Le 15C₈ 10azo, l'AMP dont l'effet a été étudié pendant ces travaux de thèse. Sur un acide poly (acrylique) sont ancrés 15% (mol) de groupes octyles et 10% (mol) de groupements azobenzène.

Les groupements azobenzène permettent à l'AMP d'adopter deux conformations différentes : *cis* et *trans*. La conformation *trans* étant moins compacte et presque non polaire, alors que la conformation *cis* est plus globulaire et plus polaire, comme montré figure II.9. Le temps nécessaire pour la photo-isomérisation est de l'ordre de la ps.

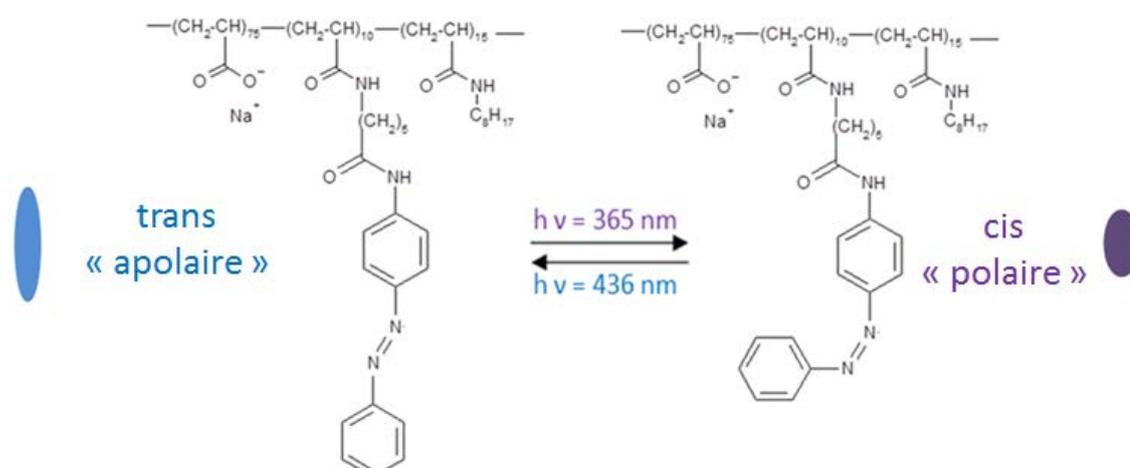


Figure II.9 : Les deux conformations de l'AMP : Conformation *trans* (à gauche) et conformation *cis* (à droite). Le basculement entre les deux conformations se fait par illumination à la longueur d'onde appropriée.

L'AMP dans sa conformation *cis* (*cis* – AMP) n'est *a priori* pas capable de perméabiliser une bicouche lipidique ; en revanche, quand l'AMP est dans sa conformation *trans* (*trans* – AMP) il est capable de s'y insérer et de la perméabiliser. Le basculement entre les deux conformations se fait par illumination à des longueurs d'ondes spécifiques : autour de 436 nm (spectre visible) pour passer du *cis* – AMP au *trans* – AMP et autour de 365 nm (spectre UV) pour passer du *trans* – AMP au *cis* – AMP.

Dans le but d'étudier cet effet, de mieux caractériser l'interaction avec la bicouche lipidique et le mécanisme de perméabilisation associé, deux systèmes modèles, les liposomes et les BLM, ainsi que des cellules vivantes ont été utilisés. Différentes méthodes expérimentales, qui seront développées par la suite, ont été mises en œuvre.

B. PARTIE EXPERIMENTALE

III. Etude dans des systèmes modèles : GUV

Afin d'examiner l'effet perméabilisant de l'AMP (15C8 10azo), des géantes vésicules unilamellaires (GUV) encapsulant des sondes fluorescentes de trois poids moléculaires différents ont été préparées à partir d'un mélange lipides/AMP et elles ont été observées en microscopie de fluorescence et à contraste de phase. Le basculement en conformation *trans* de l'AMP se fait par illumination en lumière blanche (incluant donc les longueurs d'onde autour de 436 nm).

III.1. La microscopie

III.1.a. Microscopie à contraste de phase

La microscopie à contraste de phase a été conçue par Frits Zernike en 1930, ce qui lui a valu de recevoir le Prix Nobel de Physique en 1953. Elle transforme des différences d'indices de réfraction en différences de phase pour les ondes lumineuses, permettant ainsi l'observation d'objets parfaitement transparents, dès lors qu'il y a une faible variation de trajet optique (variation d'épaisseur ou d'indice de réfraction) dans leur structure ou avec leur environnement.

Quand le bord d'une structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Ces rayons déphasés sont filtrés par un jeu d'anneaux - appelés anneaux de phase - ce déphasage ayant comme résultat une image avec un contraste accentué du contour de la structure. Un des anneaux de phase est placé dans le condenseur (le système optique qui focalise la lumière sur l'objet) produisant un cône de lumière qui est superposé avec l'autre anneau situé dans l'objectif.

La microscopie à contraste de phase permet de s'affranchir de la coloration des objets ; pour cela, elle est beaucoup utilisée en biologie (pour observer par exemple des cellules vivantes). Elle est encore plus utile pour des objets ayant très peu de contraste, comme les GUV.

III.1.b. Microscopie de fluorescence

Un des progrès les plus importants concernant le développement de la microscopie est la microscopie de fluorescence (années 1960). Cette dernière permet d'observer un échantillon (fluorescent ou marqué en fluorescence) convenablement illuminé et excité en détectant la lumière de fluorescence émise.

La fluorescence est la propriété que possèdent certaines molécules d'émettre des photons d'une certaine énergie après avoir absorbé des photons de plus forte énergie, c'est à dire de plus courte longueur d'onde. En absorbant les photons, les molécules passent dans un état excité et afin de revenir à leur état fondamental, elles émettent des photons de manière presque simultanée (figure III.1). Cette propriété peut être utilisée pour différencier différentes régions d'un objet ou pour différencier l'objet lui-même de son environnement.

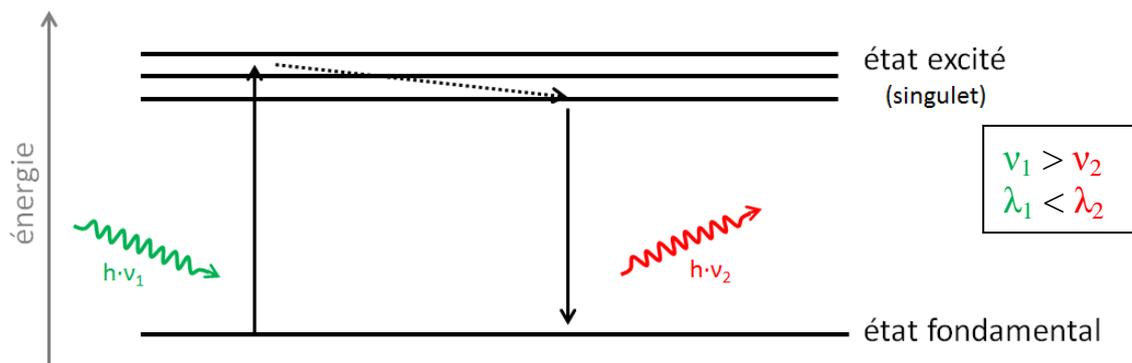


Figure III.1 : Schéma simplifié des transitions d'état d'un électron : absorption (flèche verte) et émission (flèche rouge).

Il existe des molécules qui ont une fluorescence intrinsèque. Elles peuvent être observées en fluorescence sans aucune modification. Cependant, la plupart des molécules n'ont pas de fluorescence intrinsèque ; dans ce cas, des marqueurs fluorescents sont utilisés. Les fluorophores peuvent être fixés sur des sites spécifiques par l'intermédiaire de groupements chimiques ou diffuser dans l'échantillon). Les objets sont alors repérés par le rayonnement qu'ils émettent sous l'effet d'un rayonnement exciteur. Grâce au greffage de groupements fluorescents sur des molécules comme les protéines ou les lipides, des analogues fluorescents des molécules à étudier sont

fabriqués, ce qui peut faciliter énormément l'étude de telles molécules. En revanche, il faut noter que, contrairement à la microscopie à contraste de phase, la microscopie de fluorescence nécessite l'introduction d'un fluorophore extrinsèque qui modifie la molécule étudiée et peut conduire à des artéfacts. Des fluorophores souvent utilisés sont la rhodamine, la fluorescéine et le NBD (NitroBenzoxaDiazole).

Le microscope est équipé d'un jeu de filtres et d'un miroir dichroïque - spécifiques pour chaque type de fluorophore, le tout étant regroupé dans un cube de fluorescence, comme celui montré sur la photo de la figure III.2. Un miroir dichroïque est un miroir réfléchissant les rayons lumineux dont la longueur d'onde se situe en dessous d'une certaine longueur d'onde et laissant passer les rayons de longueur d'onde supérieure.

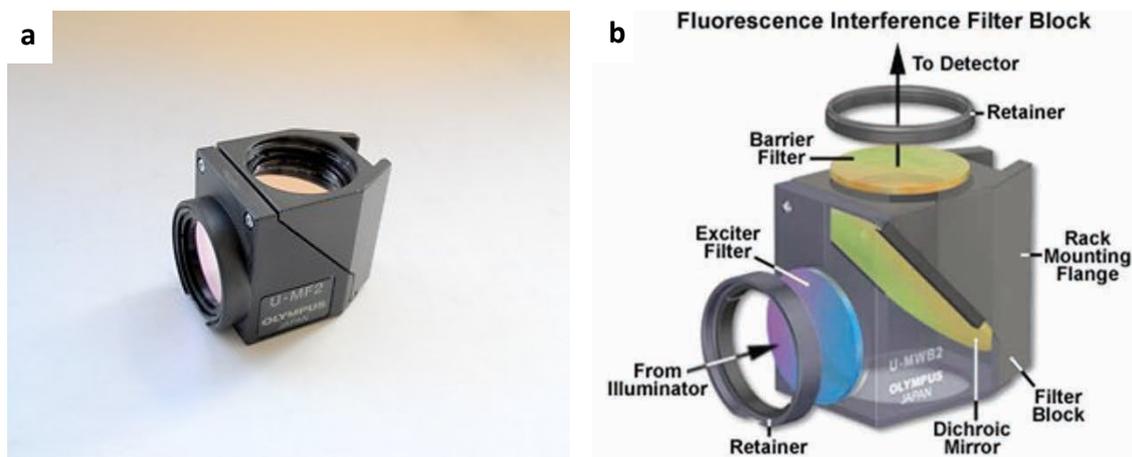


Figure III.2 : Photo (a) et description (b) d'un cube de fluorescence, contenant le jeu de filtres et le miroir dichroïque. Images tirées du site web d'*Olympus*.

Le filtre d'excitation permet de sélectionner la longueur d'onde qui va exciter l'échantillon, le miroir dichroïque, orienté à 45°, réfléchit cette lumière d'excitation vers l'objectif du microscope et donc vers l'échantillon qui émet de la fluorescence. Enfin, le filtre d'émission permet de sélectionner la lumière attendue en éliminant certaines longueurs d'ondes parasites (émises par le fluorophore ou par d'autres sources, en particulier l'éventuelle diffusion de la lumière d'excitation), afin de garder la région qui nous intéresse.

Il est possible de travailler avec plusieurs fluorophores simultanément en utilisant différents cubes de fluorescence. Lors d'un double marquage, les bandes passantes de

filtres doivent être suffisamment distinctes pour pouvoir séparer la lumière émise par chaque fluorophore indépendamment, même si, en réalité, il y a toujours des « contaminations » d'un fluorophore à l'autre.

Les caractéristiques spectrales des jeux de filtres adaptés à la fluorescence de la Rhodamine B et du NBD, utilisés pendant ces travaux de thèse sont montrés figure III.3.

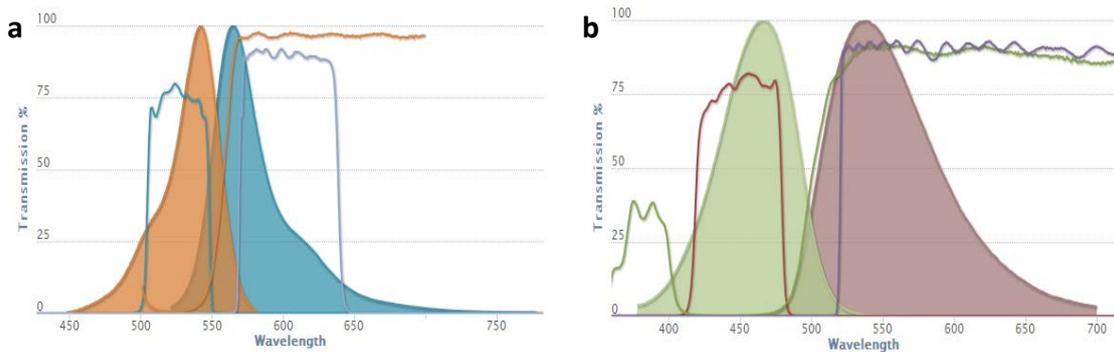


Figure III.3 : Spectres d'excitation et d'émission pour les deux fluorophores utilisés pendant ces travaux de thèse. Les bandes passantes des filtres d'excitation et d'émission ainsi que la longueur d'onde de coupure des miroirs dichroïques sont superposées: **a.** Rhodamine B, **b.** NBD. Les spectres ont été désignés à l'aide du site *web d'Omega Optical*.

Notons que dans le cas d'une illumination prolongée et trop intense il peut y avoir du photoblanchiment (extinction irréversible de la fluorescence).

III.2. Observation des GUV en microscopie

III.2.a. Préparation des *pol* – GUV

Des vésicules géantes unilamellaires (GUV) ont été préparées à partir d'un mélange de DOPC auquel est ajouté un analogue fluorescent de la PC afin de marquer la bicouche en fluorescence (NBD (NitroBenzoxaDiazole) – PC). Les GUV ont été fabriquées selon la méthode d'électroformation (introduite en 1986 par Angelova *et al.* (Angelova and Dimitrov 1986) et modifiée en 1996 par Mathivet *et al.* (Mathivet, Cribier *et al.* 1996)) en utilisant l'appareil « *Vesicle Prep Pro* » de *Nanion Technologies*.

Le principe de la méthode est d'hydrater un film lipidique sous un champ électrique oscillant. Elle permet la préparation des vésicules à partir d'une grande variété de lipides, sous réserve que l'ensemble ne contienne pas une charge nette trop importante.

Le milieu interne des GUV et de *pol* – GUV préparées (saccharose à 300 mM) est marqué en rhodamine B à l'aide des dextrans fluorescents (RITC ou TRITC dextrans) de différentes masses moléculaires. Le pH du tampon de gonflement est de 8,5 pour que les conditions soient défavorables à la perméabilisation membranaire (AMP trop protonné) pendant la fabrication et la conservation des GUV.

Les dextrans sont choisis car il s'agit de macromolécules (polyglucose) non chargées qui sont inertes, solubles dans l'eau, disponibles en plusieurs poids moléculaires et marqués avec un fluorophore. De manière générale, tous les dextrans sont de haut poids moléculaire et peuvent donc notablement changer la densité d'un milieu, même si ils sont ajoutés en faible concentration.

Le protocole expérimental est détaillé dans la partie D (matériel et méthodes).

III.2.b. Acquisition des images

Afin de suivre l'effet perméabilisant du 15C₈ 10azo, le contraste de l'intensité entre le milieu intérieur et le milieu extérieur de ces vésicules a été suivi. Une fuite éventuelle du milieu intravésiculaire, provoquée par sa sortie *via* des structures de perméation créées, se traduirait par une diminution de fluorescence de l'intérieur des GUV et donc une diminution du contraste de l'intensité de fluorescence entre leur intérieur et leur extérieur au cours du temps. Le suivi temporel de ce contraste permet de plus de suivre la cinétique de fuite éventuelle.

Les GUV sont placées sous lumière UV pendant ~5 min afin de garantir le non passage de l'AMP en conformation *trans*. Les GUVs sont placées dans une boîte de Petri dont le fond est modifié et constitué d'une lamelle de verre, montrées figure III.4 (MatTek Corporation). Cela permet de les observer en microscopie, avec un microscope inversé, (Olympus IX7, Japan). La lamelle du fond de la boîte est préalablement traitée à la BSA afin de limiter les interactions des lipides avec le verre.

Ensuite, toujours sous illumination UV, les GUV sont diluées 200 fois dans un milieu glucose (50 mM), soit à pH 7 (conditions perméabilisantes du *trans* - AMP), soit à pH 8,5 (conditions non perméabilisantes). Une différence d'osmolarité existe entre le milieu intra et le milieu extra-vésiculaire, le milieu extravésiculaire ayant la plus grande osmolarité (écart de ~15 mOsm sur ~112 mOsm). La différence de densité entre les deux milieux permet la sédimentation des GUV et facilite leur observation (celles-ci sont sinon dispersées dans tout le volume et diffusent rapidement, ce qui rend pratiquement impossible leur observation).

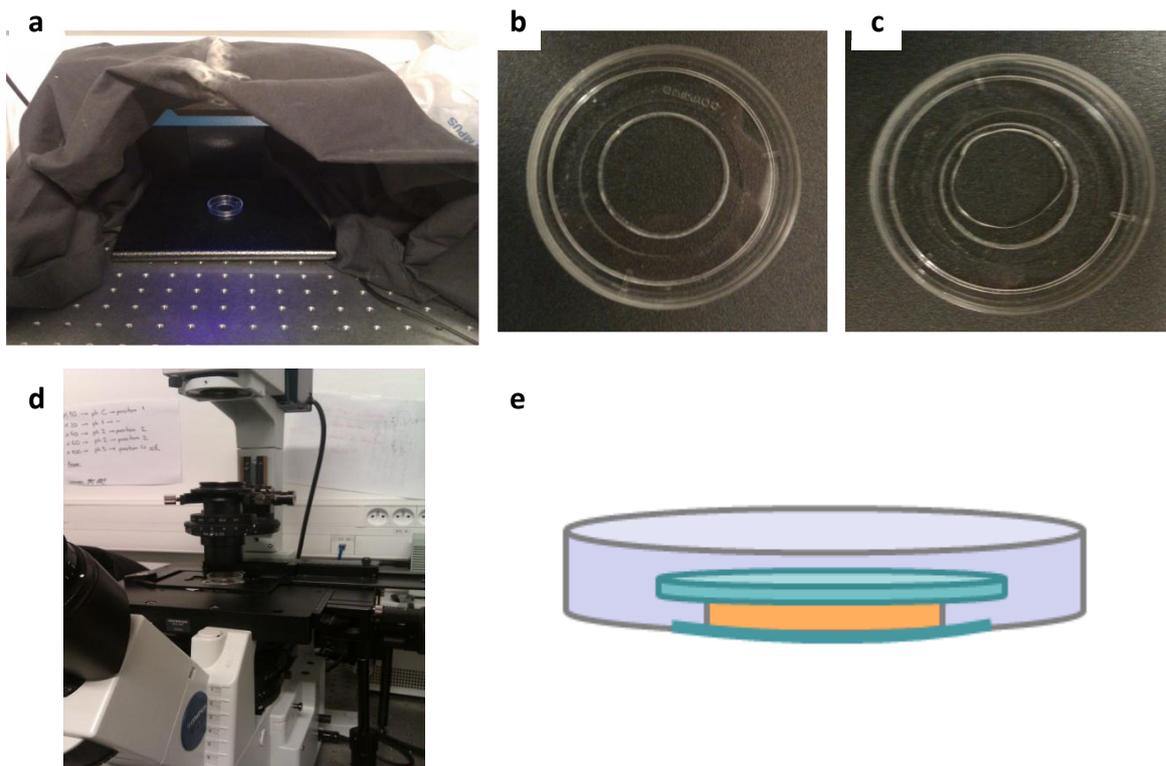


Figure III.4 : Les GUV sont laissées à sédimenter sous UV (a), une lamelle de verre faisant office de couvercle est posée dans la boîte *MatTek*[™] utilisée (b) pour délimiter une chambre d'observation (c) et la boîte est placée sur la platine du microscope (d) schéma de la chambre d'observation délimitée par le fond de la boîte et la lamelle (e).

Dès que les GUV ont sédimenter une lamelle de verre est posée par-dessus, faisant office de couvercle et délimitant une chambre d'observation (figure III.4.b). Ensuite, la boîte est enlevée de la lumière UV et transportée sous le microscope. L'ensemble des vésicules est observé en fluorescence pendant quelques minutes afin de trouver une région avec des vésicules représentatives et de taille satisfaisante. L'observation est faite en fluorescence (excitation à 542 nm) pour éviter le basculement prématuré en *cis* – AMP (qui se fait à 436 nm). Après avoir choisi la région à suivre et quand il s'agit d'une expérience avec des *trans* - AMP, la lumière blanche du microscope (destiné *a priori* pour la microscopie optique) est allumée (contenant 436 nm) et l'AMP bascule en conformation *trans*. La vésicule est illuminée en permanence jusqu'à la fin de l'expérience. Lorsque l'expérience est conduite en présence d'AMP en conformation *cis* la lumière blanche n'est pas utilisée, et au contraire, des flashes de lumière UV sont envoyés toutes les demi-heures pour éviter que l'AMP ne relaxe en conformation *trans*.

Par la suite, les GUV sont observées et des photographies sont prises toutes les 2 ou 3 minutes en fluorescence et/ou en contraste de phase.

III.2.c. Traitement des images

Dans le but d'étudier l'évolution du système, le contraste entre le milieu interne et le milieu externe de chaque vésicule est suivi au cours du temps. Pour chaque image, l'intensité lumineuse est mesurée à l'aide du logiciel *ImageJ* et le contraste calculé de la manière suivante :

Le profil d'intensité le long d'un diamètre de la vésicule étudiée est tracé pour chaque image. Auparavant, un filtre de lissage a été utilisé (filtre « moyen » d'*ImageJ*, c'est à dire pour chaque pixel prendre la moyenne incluant les 4 pixels voisins).

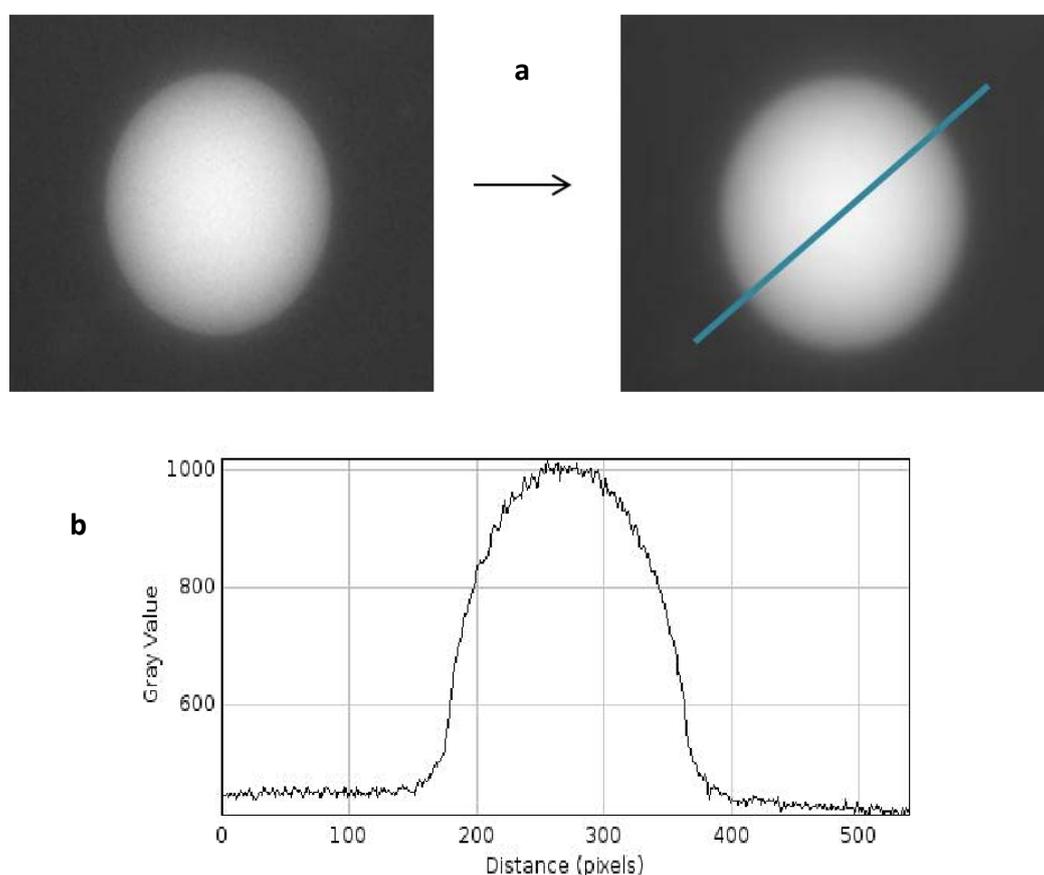


Figure III.5 : Le profil d'intensité le long d'une ligne contenant un diamètre de la *GUV* : **a.** l'image de la vésicule prise en microscopie de fluorescence (à gauche). Un filtre de lissage est appliqué et une droite contenant un diamètre de la vésicule est tracée (à droite) **b.** le profil de l'intensité de fluorescence est tracé. Tout le traitement est réalisé avec le logiciel *ImageJ*.

À partir de ce profil les valeurs de l'intensité maximale et minimale sont déterminées, correspondant à l'intensité au centre et aux "bords" du profil, toujours à l'aide d'*ImageJ*. Ces intensités maximale et minimale sont respectivement attribuées aux intensités à

l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule et notées I_{int} et I_{ext} . Le contraste C_i est défini comme la différence d'intensité de fluorescence entre les deux milieux et est alors calculé pour chaque cliché.

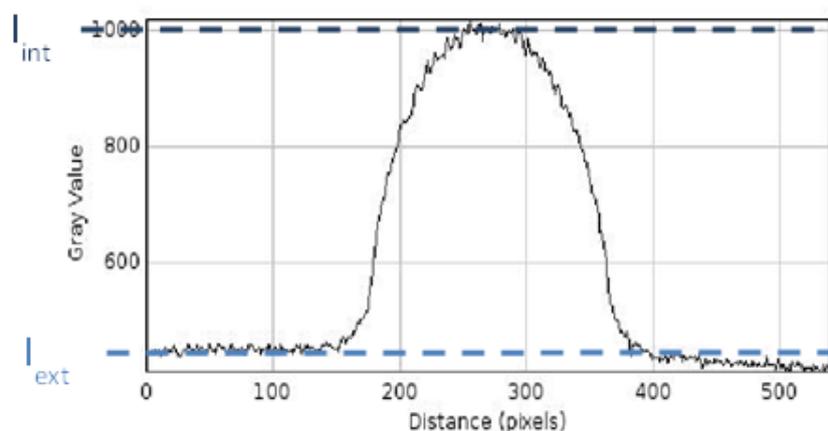


Figure III.6 : Une intensité maximale et une intensité minimale sont pour chaque image considérées comme les intensités de fluorescence de l'intérieur et de l'extérieur de la vésicule.

Une analyse plus rapide aurait pu être de se contenter du suivi de l'intensité maximale (intérieur de la vésicule) mais on s'affranchit ainsi des éventuelles variations du fond lumineux. Nous avons vérifié que l'intensité "extérieure" correspondait bien au fond lumineux "loin" de la vésicule. Ensuite, l'évolution du contraste en fonction du temps est tracée pour chaque vésicule. Le temps 0 (t_0) est défini comme le temps où la première image est prise pour les expériences faites en *trans* et en *cis* (qui dans le cas des expériences en *trans* - AMP, correspond en effet au début du temps d'illumination des GUV en lumière blanche - et donc du début du passage en conformation *trans* - AMP).

Des expériences similaires sont faites, en l'absence d'AMP pour mesurer l'effet de l'éclairement en l'absence de polymère (contrôle). Ces mêmes expériences servent de façon à quantifier l'effet de la présence du polymère sur la diminution du contraste.

Après avoir traité les données obtenues au cours du temps et en ayant suivi le même processus pour toutes les GUV, une courbe moyenne est tracée pour chaque dextrane d'un poids moléculaire spécifique en prenant en compte toutes les séries de données obtenues dans les mêmes conditions expérimentales.

III.3. Résultats (*trans* – AMP)

III.3.a. Ajustement de données obtenues

Comme il a été vu au paragraphe précédent, le contraste entre le milieu intra- et extra-vésiculaire peut être suivi au cours du temps. Pour les *pol* – GUV, une diminution de ce contraste de fluorescence a été constatée. Ceci est le cas pour toutes les *pol* – GUV observées ; un exemple est montré figure III.7. Ici le dextrane utilisé est le RITC Dextrane 70 (70 kDa).

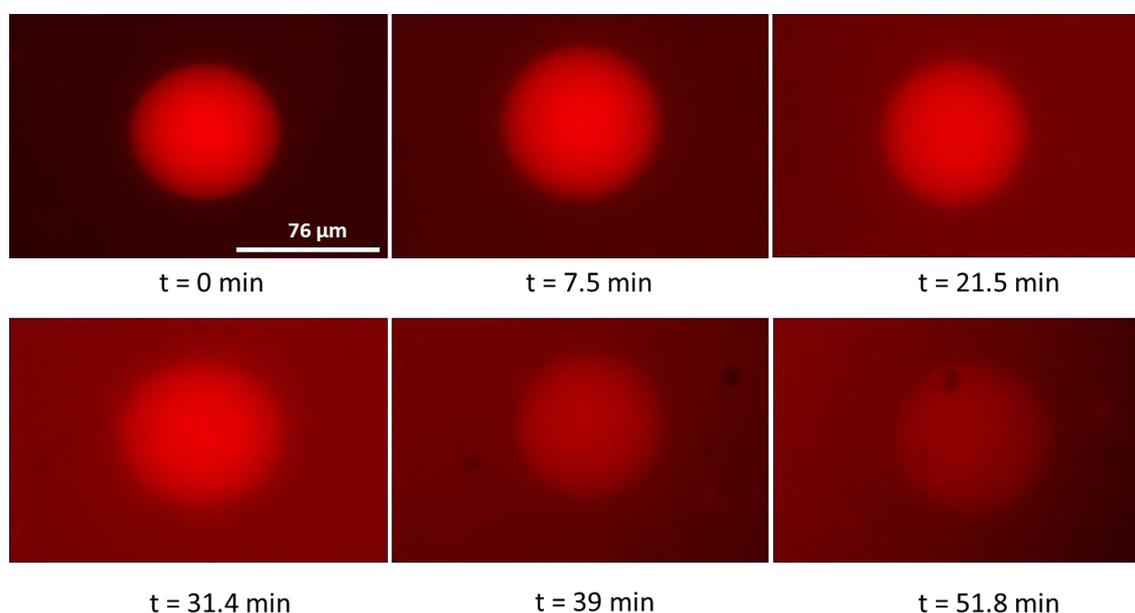


Figure III.7 : Une perte du contraste au cours du temps entre le milieu intérieur et le milieu extérieur d'une *pol* – GUV (marqué au RITC-Dextran 70kDa à 4 g/L).

Les courbes de décroissance du contraste en fonction du temps sont obtenues en suivant le processus décrit dans le paragraphe précédent. Différents types d'ajustement ont été testés (logiciel utilisé *GraphPad Prism*) et le meilleur correspond à un ajustement exponentiel (figure III.8). Le contraste diminue donc selon une loi exponentielle.

Afin de pouvoir comparer les différentes conditions, une normalisation en pourcentage a été faite. Le 100% de contraste a été défini comme la valeur du contraste à t_0 , donnée par l'ajustement exponentiel, et les courbes ont été retracées en pourcentage (figure III.8.b).

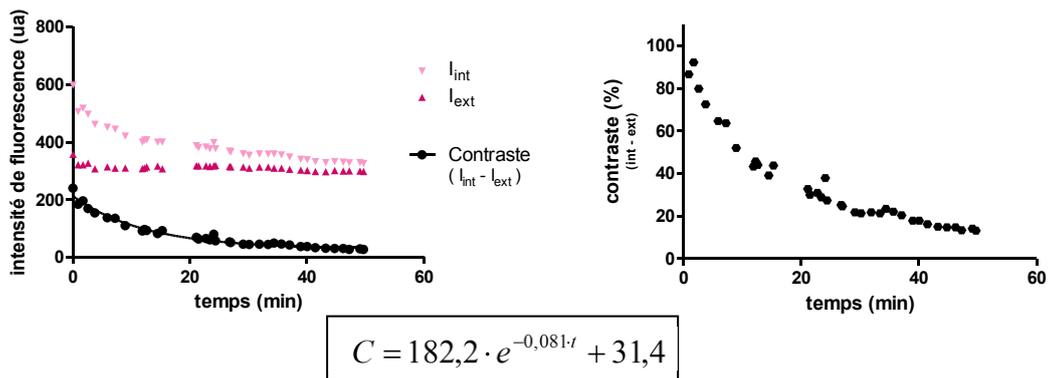


Figure III.8 : À l'aide du logiciel *GraphPad Prism* un ajustement du contraste sur les points expérimentaux est réalisé. Ici, il s'agit d'une *pol* – *GUV* encapsulant du *Sucrose* 300 mM, *Tris* 20 mM, *RITC-Dextran* 10kDa à 4 g/L. À gauche les données brutes (l'intensité de fluorescence à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule, ainsi que la différence entre les deux) en unités arbitraires. L'ajustement du contraste (équation indiquée et encadrée) permet de déterminer le contraste initial (normalisé ensuite à 100%) de la première courbe tracée et d'exprimer le contraste en pourcentage. À droite, l'évolution du contraste normalisé (en pourcentage) au cours du temps.

Cette normalisation à 100% permet de regrouper toutes les mesures des expériences réalisées avec la même sonde fluorescente et dans les mêmes conditions expérimentales ; tous les points de différentes expériences peuvent donc être représentés dans un graphe commun (figure III.9).

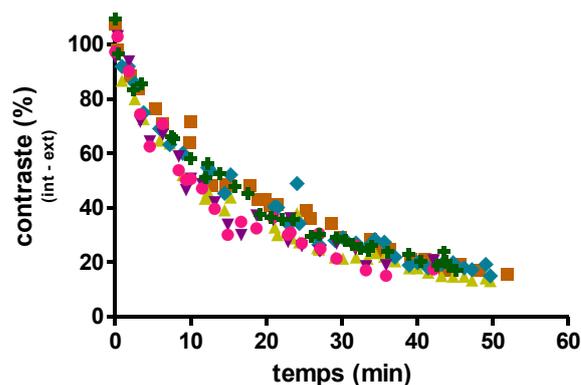


Figure III.9 : Ensemble des points expérimentaux pour un dextrane fluorescent d'un poids moléculaire spécifique (ici le 10 kDa). Les différents symboles correspondent à différentes expériences.

La figure III.9 fait apparaître une bonne reproductibilité des mesures et un ajustement exponentiel de l'ensemble des points représentés est montré sur la figure III.10. Ici la

sonde montrée afin de détailler sur le processus est le RITC Dextrane 10 kDa. La totalité des résultats sera donnée par la suite (paragraphe III.3).

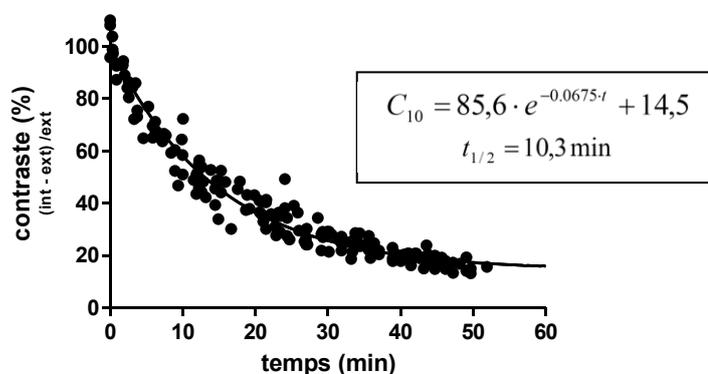


Figure III.10 : La courbe tracée par ajustement exponentiel à partir des points expérimentaux de plusieurs séries de données pour des *pol* – GUV encapsulant du RITC – Dextrane 10 kDa.

Notons ici que, effectivement, la perte de contraste suivie en microscopie de fluorescence peut également être suivie en microscopie en contraste de phase, étant donnée la différence d'indice de réfraction entre les deux milieux. Ce type de visualisation a été utilisé pour quelques expériences ; cependant, le choix de la microscopie en fluorescence a été fait pour la cinétique des vésicules, car les résultats sont plus précis, la microscopie en contraste de phase étant plus sensible à la mise au point.

Cette perte de contraste suivie est interprétée comme une fuite du milieu interne qui, libéré au milieu extra-vésiculaire, aura comme résultat la diminution de l'intensité de fluorescence à l'intérieur de la vésicule et l'augmentation (extrêmement lente étant donné la dilution importante des GUV dans du milieu non fluorescent) de l'intensité de fluorescence du milieu extérieur.

Avant de conclure sur l'existence des structures de perméation à l'origine de cette diminution, il faut mesurer la contribution des autres phénomènes, comme par exemple l'éclatement des GUV sans qu'elles soient perméabilisées ou le photoblanchiment.

Concernant la première hypothèse, la microscopie à contraste de phase a été utilisée ; ces résultats donnant la possibilité de vérifier si la vésicule est toujours présente - même si l'écart entre les indices de réfraction des deux milieux a diminué – ou si la perte de contraste est liée éventuellement à son éclatement. Quelques vésicules éclatent et se vident brutalement, mais le phénomène est observé à la même fréquence (faible) en l'absence d'AMP. Ce phénomène d'éclatement est de toutes façons repérable en fluorescence, (disparition brusque d'une « bulle » de fluorescence qui diffuse de manière inhomogène et beaucoup plus rapide que la perte d'intensité observée d'habitude avec les *pol* – GUV ou les GUV contrôle).

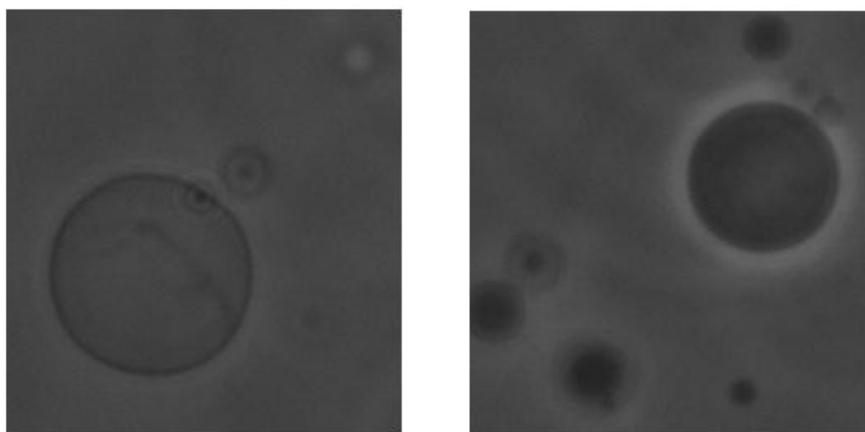


Figure III.11 : Deux *pol* – GUV dans la même boîte de Petri (observées simultanément en contraste de phase). La vésicule à gauche a un contraste plus faible, indiquant qu'elle s'est vidée partiellement de son contenu initial, alors que la vésicule à droite est beaucoup plus contrastée indiquant qu'elle est encore très pleine. La différence en contraste de phase est aussi évidente.

Dans le même but, les vésicules ont aussi été observées en microscopie de fluorescence avec le cube de fluorescence adapté au NBD (rappelons que les bicouches sont marquées au NBD – PC). Cependant, étant donnée la longueur d'onde d'excitation pour le NBD (466 nm) et la longueur d'onde de basculement de la conformation *cis* à la conformation *trans* pour l'AMP (436 nm), cette sonde n'a été finalement utilisée que pour de très courtes durées et quand l'AMP était déjà en *trans*, afin de ne pas modifier les conditions expérimentales.

Si ce premier contrôle est mis en place pour éliminer l'hypothèse d'un artefact peu probable, la perte de contraste de fluorescence entre les milieux extra- et intra –

vésiculaires à cause du photoblanchiment ou d'autres raisons, comme l'augmentation de pression osmotique du milieu externe - elle-même liée à l'évaporation - ne paraît pas si invraisemblable. Pour cela, des GUV contrôles (purement lipidiques, sans AMP) ont été préparées et l'évolution du contraste entre le milieu intérieur et extérieur a été étudiée de la même façon que celle décrite pour les *pol* – GUV. Le résultat (pour plusieurs séries de données des manipulations réalisées dans les mêmes conditions) est montré figure III.12. La perte de contraste est importante, mais elle présente des caractéristiques différentes de celle obtenue précédemment.

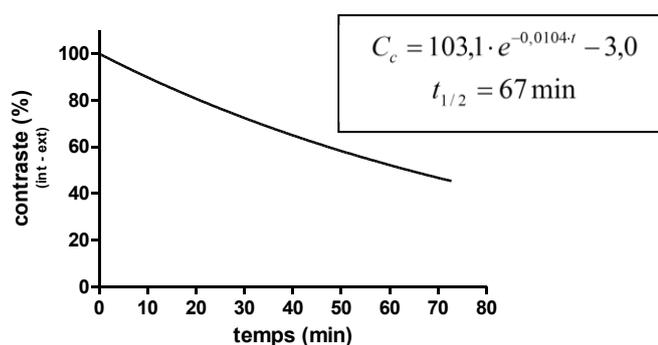


Figure III.12 : La courbe définie pour les GUV témoins (ne contenant pas d'AMP) étudiées dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans le but d'éliminer toute autre « contamination » des données (présente aussi aux GUV témoins, donc la contribution à la décroissance qui n'est pas liée à la présence de l'AMP), la courbe obtenue pour les GUV contrôle, qui est montré à la figure III.12, a été utilisée pour retracer celle définie par les données expérimentales en déconvoluant les deux (figure III.13).

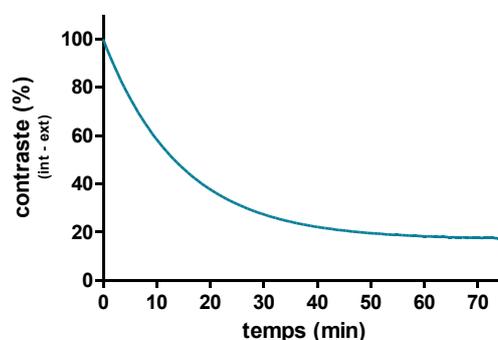


Figure III.13 : La courbe tracée pour des *pol* – GUV encapsulant du RITC – Dextrane 10 kDa, après corrections des données pour prendre en compte le comportement des GUV contrôles.

III.3.b. La fuite de différentes sondes et leur cinétique

En suivant le processus décrit au paragraphe précédent une courbe est établie pour chacun des RITC – Dextranes utilisés (10 kDa, 70 kDa et 155 kDa). L'ajustement exponentiel après la correction (déconvolution avec l'exponentielle calculée pour les GUV témoins) est représenté, sur un même graphe, figure III.14.

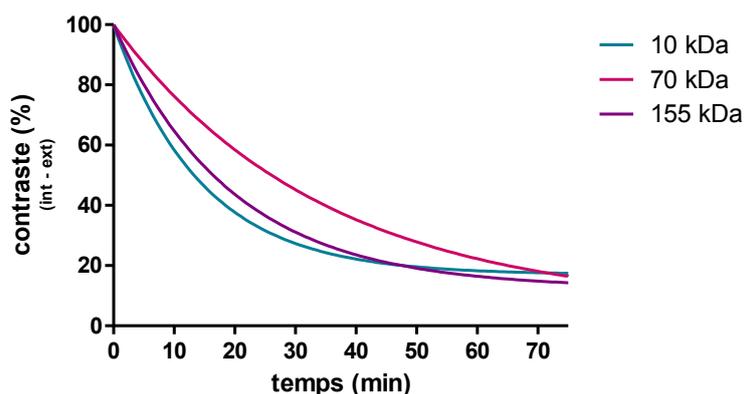


Figure III.14 : Evolution du contraste de fluorescence entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules contenant de l'AMP en conformation *trans* pour les trois poids moléculaires de RITC Dextrane utilisés après correction des données en prenant en compte les GUV témoins.

Comme le montre la figure III.14, on retrouve une diminution du contraste de fluorescence entre le milieu intra- et extra- vésiculaire pour les trois sondes fluorescentes. Cette diminution du contraste suit une loi exponentielle, exprimée par la relation $C(t) = (C_0 - C_\infty) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + C_\infty$, les caractéristiques pour les trois courbes, correspondantes aux trois sondes utilisées, sont montrées dans le tableau III.1.

Masse moléculaire	Demi – vie ($t_{1/2} = \tau \cdot \ln 2$)
10 kDa	10 ± 1 min
70 kDa	24 ± 1 min
155 kDa	13,4 ± 0,5 min

Tableau III.1 : Les valeurs et les incertitudes correspondantes pour les temps caractéristiques des trois exponentielles définies. L'ajustement est fait avec le logiciel *GraphPad Prism*.

Concernant les résultats obtenus, aucune différence importante liée à la masse moléculaire ne semble pouvoir être établie dans un premier temps.

III.4. Résultats (*cis* – AMP)

Il devient clair que les structures de perméation supposées sont la conséquence de la présence du *trans* - AMP dans les *pol* – GUV. Rappelons que le temps 0 est défini comme le temps de l'isomérisation des groupements azobenzènes de la conformation *cis* vers la conformation *trans*. Afin d'appuyer l'interprétation, les mêmes expériences ont été menées avec l'AMP en conformation *cis*.

Les données obtenues dans les expériences réalisées avec l'AMP en conformation *cis* ont été traitées de la même manière que celles obtenues pour la conformation *trans*. Un ajustement est fait à partir des données expérimentales et ensuite la contribution des phénomènes autres que ceux dus à la présence de l'AMP sont éliminés en déconvoluant la courbe des données brutes et la courbe de contrôle. Les ajustements avant et après la correction sont montrés figure III.15.

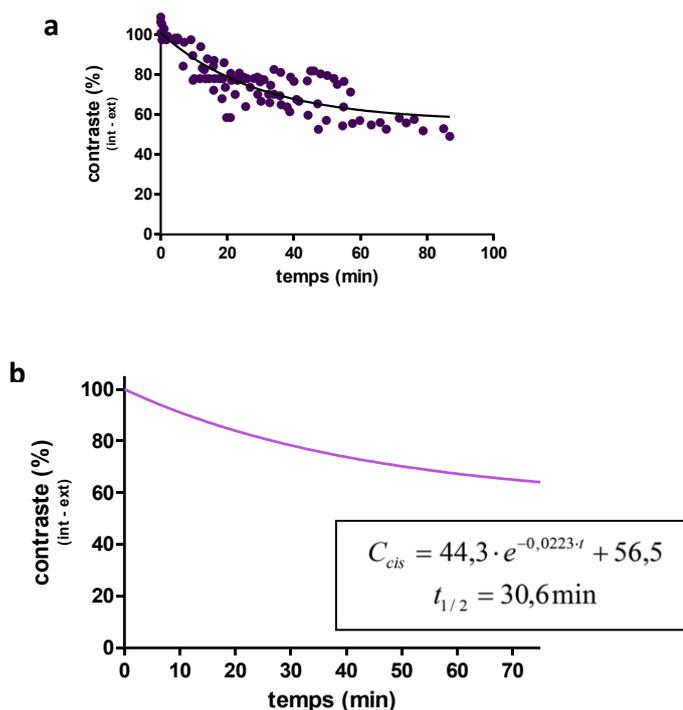


Figure III.15 : La courbe définie à partir des données expérimentales pour les *pol* – GUV avec l'AMP en conformation *cis* avant (a) et après correction (b).

En effet, il est vérifié que les *pol* – GUV contenant l'AMP en conformation *cis* perdent beaucoup moins leur contraste de fluorescence. Cela est le cas pour les trois dextrans utilisés dans nos expériences (ici sont montrés les résultats obtenus pour le RITC

dextrane de 70 kDa). Au bout de 70 minutes, le contraste entre le milieu intra- et extravésiculaire est de 65%, alors que pour les *pol* – GUV (*trans* – AMP) la décroissance observée est beaucoup plus rapide.

Cela justifie le choix fait pour le t_0 de nos expériences concernant le traitement de données : pour les *pol* – GUV contenant le *trans* – AMP le t_0 est le temps auquel la première image est prise, qui coïncide avec le temps d'illumination en lumière blanche – donc au passage de la conformation *cis* à la conformation *trans*. Dans le cas des *pol* – GUV contenant le *cis* – AMP le choix du t_0 est le même, alors que cela n'est *a priori* pas justifié : dans ce cas, le « vrai » t_0 est le moment où les *pol* – GUV sont diluées dans le tampon de sucrose à pH 7, c'est-à-dire le moment où elles sont placées sous lumière UV pour sédimenter. Cependant, l'hypothèse de départ, que l'AMP en conformation *cis* ne perméabilise pas la membrane, étant vérifiée *a posteriori*, le choix arbitraire du t_0 est plutôt justifié.

III.5. Discussion

En prenant en compte la perte de contraste pour les GUV contrôles (qui ne contiennent pas d'AMP) ainsi que la perte de contraste dans le cas des *pol* – GUV avec le *cis* – AMP, qui sont toutes les deux beaucoup plus lentes que celles suivies pour les *pol* – GUV avec le *trans* – AMP, nous pouvons attribuer la perte de contraste décrite au paragraphe 3 à la perméabilisation des *pol* – GUV due à la présence de l'AMP en configuration *trans*. Les allures de ces trois cinétiques de perte de contraste sont donc interprétées comme cinétiques de fuite du milieu intravésiculaire des *pol* – GUV.

Les structures de perméation *via* lesquelles cette fuite a lieu peuvent être le résultat direct de l'interaction entre les lipides des GUV et le *trans* – AMP après son changement de conformation (de *cis* – AMP en *trans* – AMP) suite à l'illumination en lumière blanche ou bien elles peuvent avoir pour origine les contraintes mécaniques provoquées par ces interactions, comme effet secondaire, afin de relaxer les contraintes provoquées par déstabilisation de la bicouche lipidique des *pol* – GUV.

Concernant les temps caractéristiques des trois cinétiques, aucun lien évident avec la masse moléculaire ne peut être établi, contrairement à ce qui avait été envisagé lors de la conception des expériences. Aucun lien entre la masse moléculaire de la molécule, le nombre des molécules encapsulées dans la vésicule et la quantité du milieu interne de la vésicule qui devrait fuir ne peut être fait. Une explication possible repose sur le taux de marquage des sondes utilisées. Le taux de marquage en fluorophore pour les trois dextrans utilisés reste dans la même gamme (0,2 à 1,0 % mol RITC/glu pour le dextrane de 10 kDa, 0,2 à 1,5 % pour celui de 70 kDa et environ 1 % pour celui de 155 kDa, données provenant du fournisseur *Sigma Aldrich*), mais les variations ne peuvent être complètement négligées. La dispersion du taux de marquage en rhodamine B est beaucoup plus élevée pour la sonde de 70 kDa, mais il est difficile d'imaginer en quoi cela justifierait son comportement non attendu (par rapport au comportement des deux autres sondes). La densité du milieu interne varie légèrement entre les trois conditions expérimentales et l'état d'équilibre n'a pas forcément le même taux de fluorescence.

En ce qui concerne l'ordre de grandeur de la taille de ce(s) structure(s) de perméation, ces dernières n'ont pas pu être observées en microscopie, ce qui nous conduit à l'hypothèse qu'elles doivent être de taille submicrométrique. Il est difficile d'avoir des certitudes sur la nature exacte de ces structures et leur nombre.

Le fait que les dextrans de différents poids moléculaires fuient tous les trois du milieu intravésiculaire pourrait nous donner accès à des données sur la taille des structures de perméation, même si cela reste toujours une approximation (les rayons hydrodynamiques des dextrans de différents poids moléculaires donnés dans la littérature ne coïncidant pas toujours entre eux (Arrio-Dupont, Cribier *et al.* 1996; Minton 2001)). Cependant, de manière générale, le dextrane est un polymère flexible et avec une faible longueur de persistance (Rief 1998) et il est modélisé en solution comme un pelote aléatoire (le volume de ces pelotes diminuant avec l'augmentation de la concentration) (Minton 2005; Yuan, Chyan *et al.* 2008; Zhou, Rivas *et al.* 2008). Il n'est pas donc déraisonnable d'imaginer que ses chaînes se déplient dans les vésicules et puissent passer à travers des pores de diamètre inférieur à son rayon hydrodynamique. Nous ne pouvons donc pas conclure que le diamètre du ou des pores est supérieur au rayon hydrodynamique du dextrane de plus haut poids moléculaire utilisé.

En même temps, le dépliement des macromolécules n'étant pas un processus instantané, si un ou deux des trois dextrans utilisés doivent se déplier pour traverser les structures de perméation (et pas tous), cela se serait traduit par des différences importantes entre les trois cinétiques. En revanche, l'allure des trois courbes obtenues ne nous permet pas de considérer comme forte une telle hypothèse ; les trois dextrans semblent fuir en suivant le même « mécanisme » : soit ils peuvent tous fuir sans se déplier, soit ils doivent tous se déplier avant de fuir.

Selon cette hypothèse et dans le cas où le dépliement des trois macromolécules serait nécessaire, la ou les structure(s) de perméation créée(s) aurait un diamètre inférieur au rayon hydrodynamique du dextrane 10 kDa. Comme déjà expliqué, différentes estimations sur les rayons hydrodynamiques des dextrans de différentes masses moléculaires sont rencontrées à la littérature et parfois avec des dispersions importantes, comme montré dans le tableau III.2 ; cependant, le rayon hydrodynamique du dextrane de 10 kDa est toujours placé entre 2 et 3 nm. Ces estimations nous permettent alors de supposer que, dans ce cas, nos structures auraient un diamètre inférieur à 3 nm.

Dans le cas de fuite de trois dextrans sans dépliement, ces structures devraient être supérieures au rayon hydrodynamique du dextrane utilisé avec la masse moléculaire la plus élevée : celle du 155 kDa. Une telle estimation donne des structures qui – si considérées comme des pores – doivent être supérieures à 12 nm (tableau III.2).

a	M_w moyen x 10⁻³	R_h (nm)	b	M_w moyen x 10⁻³	R_h (nm)	c	M_w moyen x 10⁻³	R_h (nm)
	9,5	1,86		9,4	2,9		10	2,36
	19,5	3,24		17,2	3,4		40	4,45
	39,1	4,78		35,6	4,9		50	4,95
	73,0	6,49		71,2	7,2		70	5,80
	110	7,82		148,0	11,9		100	6,90
	250	11,46					200	9,50

Tableau III.2 : Différentes estimations des rayons hydrodynamiques des dextrans de différents poids moléculaires. **a (vert)** : tableau tiré de (Armstrong, Wenby *et al.* 2004), **b (violet)** : tableau tiré de (Arrio-Dupont, Cribier *et al.* 1996), **c (rouge)** : tableau tiré du site internet de *TdB Consultancy*.

Pour conclure :

La fuite observée du milieu interne des pol – GUV nous amène à la conclusion que le changement de conformation de l'AMP de cis en trans résulte effectivement à la perméabilisation des vésicules : à la création des structures de perméation assez larges pour que les molécules de dextrane passent à travers, mais pas capables de déstabiliser la vésicule et de la « casser ». Cependant, de telles structures n'ont pu être observées en microscopie, ce qui permet de conclure que ces structures de perméation sont de de taille submicrométrique.

D'ailleurs, les allures des trois cinétiques obtenues pour les trois sondes fluorescentes de différente masse moléculaire nous conduisent à considérer que la fuite des trois sondes a lieu suivant le même processus : soit elles nécessitent toutes de se déplier avant d' « échapper » des pol – GUV, soit elles peuvent toutes sortir sans se déplier. Si les trois macromolécules doivent dans un premier temps se déplier avant d'avoir la possibilité de traverser les structures de perméation créées par l'interaction de la bicouche lipidique avec le trans – AMP, ces structures – décrites en terme de pore – devraient être de diamètre inférieur à 3 nm. Dans le cas contraire, elles devraient être de diamètre supérieur à 12 nm. Ces estimations sont données selon les rayons hydrodynamiques données à la littérature pour les sondes utilisées.

Afin de vérifier ces hypothèses et de compléter les données issues des manipulations sur les pol – GUV, d'autres approches expérimentales ont été utilisées et elles seront présentées par la suite.

IV. Étude dans des systèmes modèles : BLM

Par définition, l'électrophysiologie est une technique qui permet d'étudier des phénomènes électriques et électrochimiques qui se produisent dans les cellules ou les tissus des organismes vivants, soit comme résultat de l'interaction avec des partenaires biologiques, soit comme réponse à une modification provenant de l'extérieur, par exemple un stress mécanique imposé à une cellule pendant une expérience. Les canaux ioniques, ainsi que les canaux et les pores artificiels sont étudiés à l'aide de cette technique : les courants électriques au niveau d'une cellule ou d'une bicouche lipidique peuvent être mesurés en utilisant le signal électrique détecté. L'électrophysiologie sur des BLM permet de mettre en évidence la perméation de la bicouche et donner accès à ses caractéristiques, telles que le temps de vie et la taille du pore (si le pore est bien défini) (Mueller, Rudin *et al.* 1962; Ti Tien 1985).

Le BLM est modélisé par un condensateur et nous suivons sa capacité électrique et sa résistance au cours du temps à l'aide d'expériences type "électrophysiologie". Une électrode est placée dans chacun des compartiments, afin de suivre le transport des ions entre les deux compartiments lors de l'application d'une tension électrique. Dans le cas d'une bicouche imperméable, les ions ne passent pas d'un compartiment à l'autre et donc le courant détecté est nul. En présence de pores ou de canaux membranaires, un courant est détecté, lié au flux d'ions passant à travers la membrane. Le signal est ensuite amplifié, filtré, converti (A/D) et analysé. *Via* ces informations, nous avons accès aux caractéristiques de la membrane (épaisseur) et du pore (temps de vie, diamètre).

IV.1. Electrophysiologie dans des BLM

La cellule de mesure (*Warner Instruments*) possède deux compartiments séparés par une paroi percée d'un trou de diamètre de 150 μm . Une différence de potentiel est imposée entre les deux compartiments par l'intermédiaire de deux électrodes, chacune immergée dans un des deux compartiments (figure IV.1). Les deux électrodes servent aussi à mesurer le courant circulant entre les deux compartiments. Le tout est placé dans une cage Faraday,

pour protéger le dispositif des perturbations électromagnétiques extérieures. Ensuite le signal est converti, amplifié, acquis et enregistré.

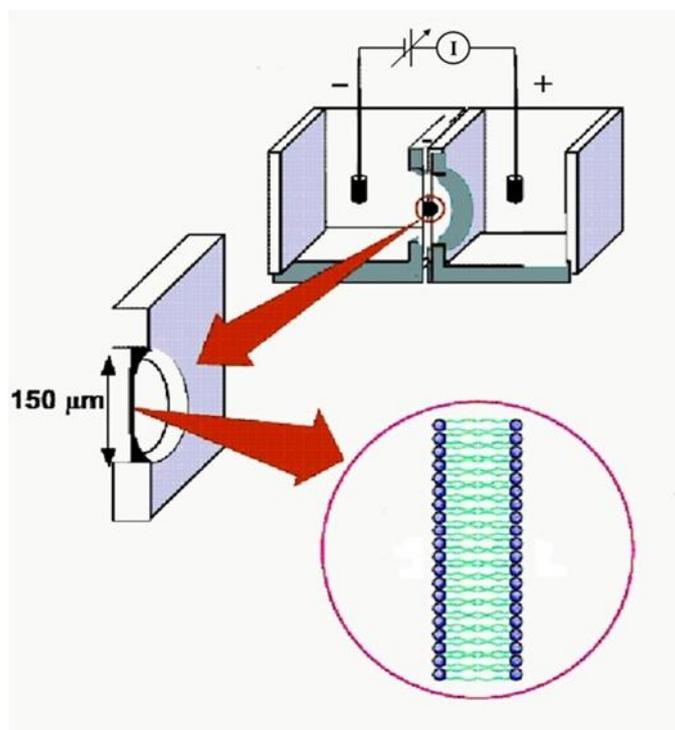


Figure IV.1 : Les deux cellules sont remplies d'un électrolyte et la bicouche est formée sur le trou qui les sépare. Deux électrodes sont placées dans chaque compartiment et une tension est appliquée.

La visualisation des signaux sur l'ordinateur, ainsi que le traitement des données sont assurés par le logiciel *Igor Pro*. Une des parois extérieures de la cellule est percée d'une fenêtre d'observation qui permet de contrôler le dépôt et la formation de la bicouche lipidique avec une lunette binoculaire.

La cuve sur laquelle se trouve le trou de 150 μm est prétraitée avec une toute petite quantité d'une solution de lipide dans le décane et, après séchage, la cuve est déposée dans l'emplacement qui lui est réservé.

Chaque compartiment de la cellule de mesure est rempli de 1 ml d'une solution d'électrolyte (KCl 1M). Une gouttelette de solution de lipides dans le décane est étalée devant le trou selon la méthode « *painting* » (Mueller, Rudin *et al.* 1962). Ensuite, les

électrodes sont placées dans chacun des deux compartiments, une tension est appliquée et le signal du courant électrique est observé et enregistré.

Après amincissement de la gouttelette de lipides (drainage du décane), une bicouche de lipides se forme. Sa formation, ainsi que son amincissement peuvent être suivis directement sur l'ordinateur qui mesure en temps réel la capacité de la bicouche, ce qui nous donne accès à l'épaisseur de la membrane.

Le phospholipide utilisé (diphytanoyl, *AvantiPolar Lipids*, figure IV.2) permet l'obtention de membranes lipidiques assez épaisses (~5 nm) et résistantes à l'insertion d'autres molécules dans la bicouche après sa formation.

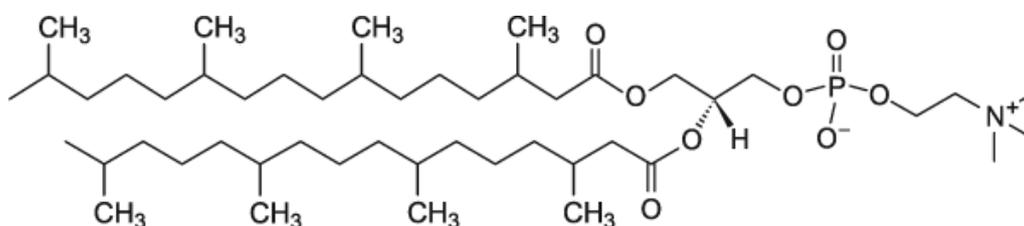


Figure IV.2 : Le 1,2 diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (diphytanoyl) est un lipide branché, utilisé pour former des films noirs. La figure est tirée du site *web d'AvantiPolar Lipids*. Il possède une tête polaire d'aire environ 5 nm² et deux chaînes hydrophobes d'environ 2-3 nm de longueur.

Le dispositif utilisé, la fabrication des BLM et l'acquisition des données sont plus détaillés dans la partie D.

Expérimentalement, l'épaisseur de la membrane peut être déterminée en mesurant la capacité C lors des expériences d'électrophysiologie. Cette capacité est directement reliée à l'épaisseur e de la membrane selon la relation :

$$C = \epsilon_0 \cdot \epsilon \cdot \frac{S}{e} \quad (\text{équation IV.1})$$

où S l'aire de la bicouche, ϵ_0 la permittivité électrique du vide et ϵ la constante diélectrique de la bicouche (~2).

Les capacités membranaires mesurées expérimentalement sont comprises entre 45 et 90 pF. Notons que l'épaisseur est sous-estimée par cette relation, la présence de solvant résiduel, modifiant le constant diélectrique de la bicouche, n'étant pas prise en compte. En effet, le film formé est initialement épais à cause de la présence de solvant qui, au cours du temps, est drainé et expulsé vers les bords grâce à la pression de Laplace. Cet amincissement de la membrane se traduit par une augmentation de la capacité électrique de la bicouche. Quand la capacité de la bicouche n'évolue plus, cela veut dire que le film noir est formé ; cependant, il reste toujours des traces du solvant utilisé.

L'AMP (*trans*-AMP ou *cis*-AMP), préalablement solubilisé dans la solution de KCl (1 mg/ml), est ajouté dans le compartiment contenant l'anode, soit avant la fabrication, soit après la fabrication de la bicouche ; dans tous les cas, il est toujours possible d'augmenter la concentration d'AMP au cours de l'expérience.

Lorsqu'une différence de potentiel est appliquée entre les deux côtés de la membrane et lorsque cette dernière est intacte, la bicouche se comporte comme un isolant et l'intensité de courant mesuré est nulle. En revanche, dès qu'une structure de perméation se forme, un courant est détecté. La valeur de l'intensité dépend de la différence de potentiel appliquée et elle est liée au taux de la perméabilisation membranaire. La largeur du saut de l'intensité correspond à la durée de la perméabilisation de la bicouche.

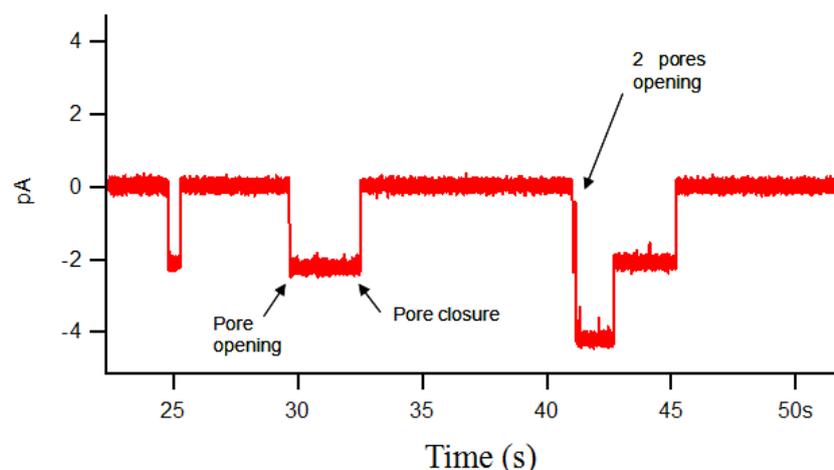


Figure IV.3 : Le profil d'un signal obtenu pour des pores bien définis. Quand la bicouche est intacte, le signal est nul, alors que, quand elle est perméable, un courant est détecté. Sa valeur est liée au taux de la perméabilisation et la largeur des créneaux correspond à la durée de la perméabilisation de la bicouche.

Dans le cas d'un pore unique et bien défini (par exemple un canal), le courant unitaire peut être défini en traçant l'histogramme pour les valeurs de courant obtenues. Ainsi, et après le même processus avec différentes valeurs de tension, la variation de l'intensité en fonction de la tension appliquée nous donne accès à la résistance de la bicouche (loi d'Ohm), qui, dans le cas le plus simple, peut être reliée aux paramètres géométriques du pore et nous donner accès à son diamètre apparent (équations IV.2 et IV.3).

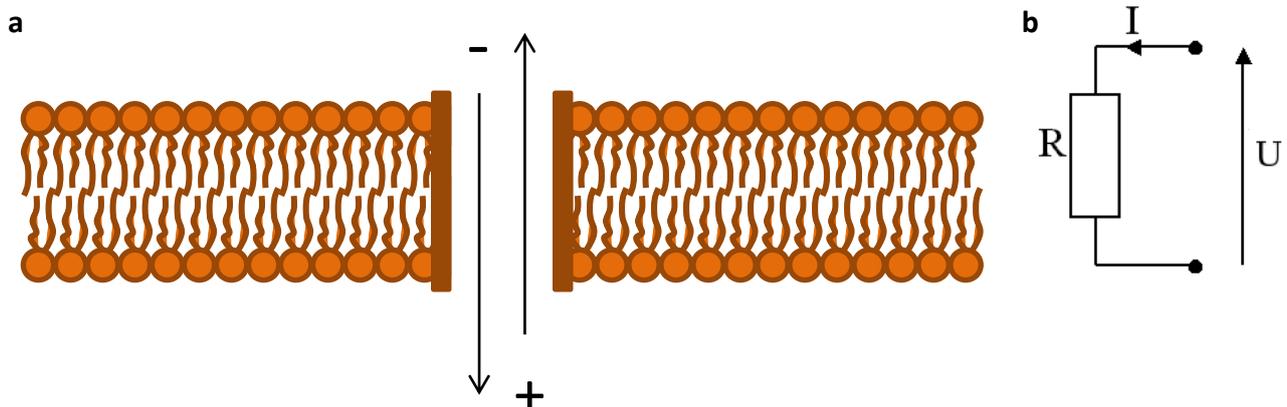


Figure IV.4 : Dans le cas d'un pore bien défini, la variation de l'intensité du courant électrique en fonction de la tension appliquée (a) nous donne accès à la résistance électrique de la membrane (b), qui par la suite peut nous donner accès à des caractéristiques géométriques du pore.

$$I = \frac{V}{R} , \text{ où } I \text{ est l'intensité du courant, } V \text{ la tension et } R \text{ la résistance de la bicouche}$$

(équation IV.2)

$$R = 4 \cdot \frac{\rho \cdot e}{\pi \cdot D^2} \text{ où } R \text{ est la résistance de la membrane, } \rho \text{ la résistivité du KCl 1M (0,0894 } \Omega \cdot \text{m, } e \text{ l'épaisseur de la bicouche et } D \text{ le diamètre du pore)}$$

(équation IV.3)

IV.2. Perméabilisation des BLM à l'aide du 15C8 10azo

Plusieurs types d'expériences et plusieurs conditions expérimentales ont été testés. Pour toutes les expériences, le polymère a été solubilisé dans KCl 1M à une concentration de 1 mg/ml. Il a été testé dans ses deux conformations : *trans* – AMP et *cis* – AMP et a toujours été ajouté dans le compartiment contenant l'anode, pour que son accès à la membrane soit facilitée, puisqu'il est chargé négativement. De plus, quelques expériences pendant lesquelles le basculement de l'AMP d'une conformation à l'autre a été déclenché ont été réalisées. La bicouche a été formée soit en absence de polymère (le polymère étant ajouté après la formation et la vérification de la stabilité de la bicouche seule), soit en présence du polymère (l'AMP étant déjà présent dans le compartiment anodique lors de la formation de la bicouche).

Une présentation des différents résultats obtenus est faite pour les différentes manipulations, afin de discuter à la fin des conclusions globales de l'effet de l'AMP sur des systèmes modèles type BLM.

IV.2.a. AMP ajouté en conformation *trans*-AMP

Sur la figure IV.5, est montré le chronoampérogramme (l'évolution du signal du courant électrique au cours du temps) d'une bicouche fabriquée en l'absence d'AMP. La bicouche est stable et non perméable (signal nul) pendant plusieurs minutes (15 min) avant l'ajout de l'AMP (ajout d'1 µg dans 1 ml de KCl), tandis que moins de 2 minutes après l'ajout de l'AMP (indiqué par une ligne verticale) un courant électrique apparaît et reste relativement stable environ 5 minutes, puis le signal revient à la ligne de base (0 pA), qui est la signature d'une bicouche ne permettant pas aux ions de passer d'un compartiment à l'autre. Avant de revenir à la ligne de base, un signal « intermédiaire » - entre les deux valeurs majoritairement présentes - est apparu pendant environ 40 secondes, qui est un délai significatif à l'échelle des interactions au niveau de la bicouche (de manière générale tout événement qui dure plus de 1 ms est considéré comme significatif).

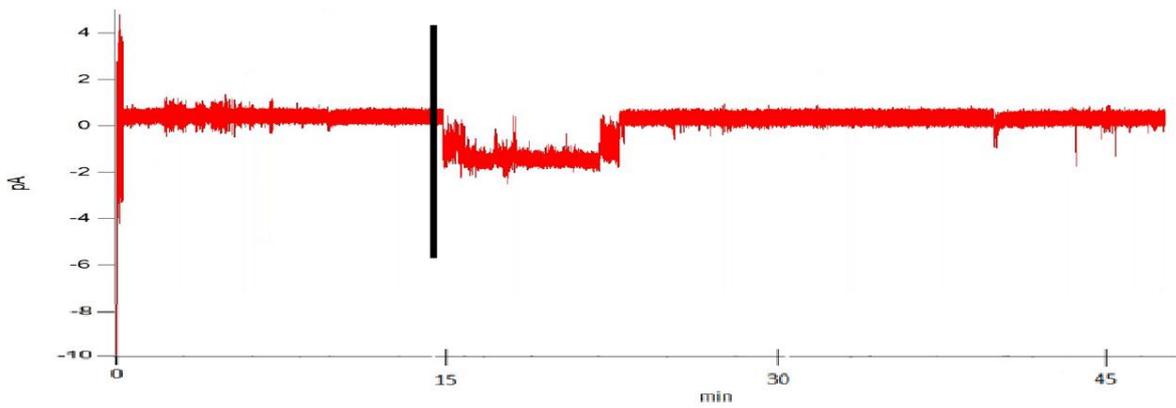


Figure IV.5 : Trace électrique obtenue sur une bicouche de 36 pF en présence de trans-AMP (1 μ g/ml dans le compartiment anodique) – ajout au moment indiqué par la ligne verticale ($\sim 15^{\text{e}}$ min) – tension appliquée -100mV.

Ici, la capacité de la bicouche est de 36 pF, ce qui correspond à une épaisseur de 8,7 nm. Il s'agit donc d'une bicouche assez épaisse, ce qui pourrait être la raison du signal assez faible qui apparaît. Tout de même, étant donné le profil du signal au cours du temps, il s'agit d'une perturbation et une perméabilisation (même très petite) de la bicouche et pas de bruit de fond, puisque les deux états sont bien distincts.

La figure IV.6 présente l'évolution du signal du courant électrique au cours du temps pour une bicouche de capacité de 49 pF, ce qui correspond à une épaisseur de 6,4 nm. La bicouche a été formée en absence d'AMP, puis 1 μ l du polymère (soit toujours 1 μ g d'AMP dans 1 ml d'électrolyte) a été ajouté dans le compartiment anodique (40 min après, indiqué par une ligne verticale pointillée). Avant l'ajout du polymère, le courant est nul. Après l'ajout de l'AMP (environ 28 minutes plus tard), la membrane est perméabilisée et le courant mesuré varie de -20 et -80 pA. Toute l'évolution est présentée sur la figure IV.6.a et un agrandissement (dilatation du temps) proche du moment de la première perméabilisation de la bicouche (entourée par un carré sur la figure IV.6.a et donné sur la figure IV.6.b).

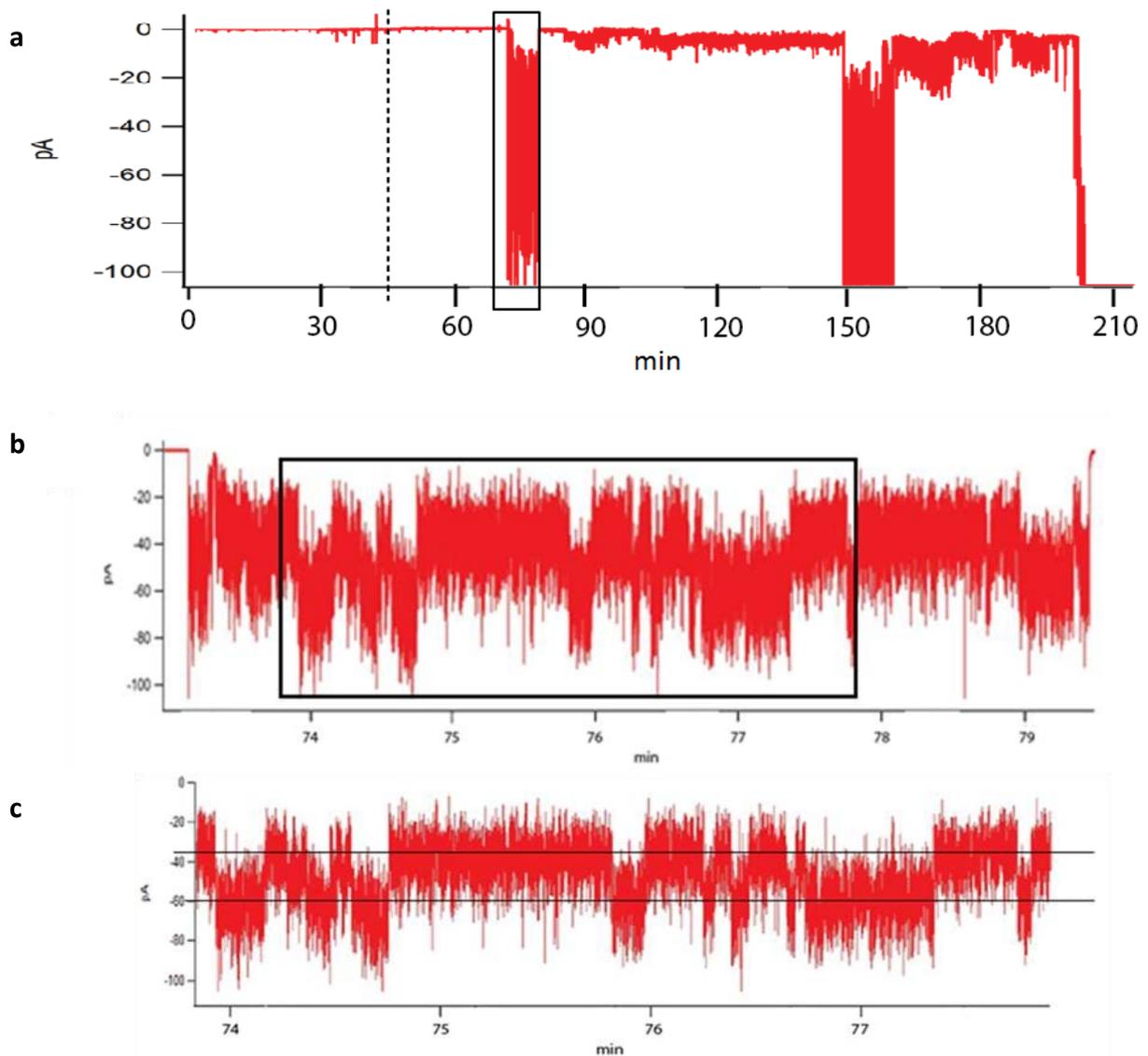


Figure IV.6 : **a.** Trace électrique obtenue sur une bicouche de 49 pF en présence de *trans*-AMP (1 μ g/ml dans le compartiment anodique) – ajout au moment indiqué par la ligne pointillé verticale (~15^e min) – tension appliquée -100mV. **b.** un « zoom » du premier événement qui apparaît (partie encadrée dans la première figure). **c.** en zoomant plus, deux valeurs majoritaires sont clairement distinguées, ainsi que les oscillations entre ces deux courants.

Comme il peut être observé en zoomant plus (figure IV.7), il y a deux valeurs majoritaires, une autour de -45 pA et une d'environ -60 pA, valeurs entre lesquels le signal bascule. Leur existence peut aussi être vérifiée en traçant l'histogramme de fréquence des valeurs d'une trace électrique. Les histogrammes correspondants sont montrés figure IV.7. L'échelle utilisée ici est une échelle logarithmique, permettant de distinguer les pics, en évitant en même temps la perte des données à cause des grands écarts entre les valeurs de fréquence.

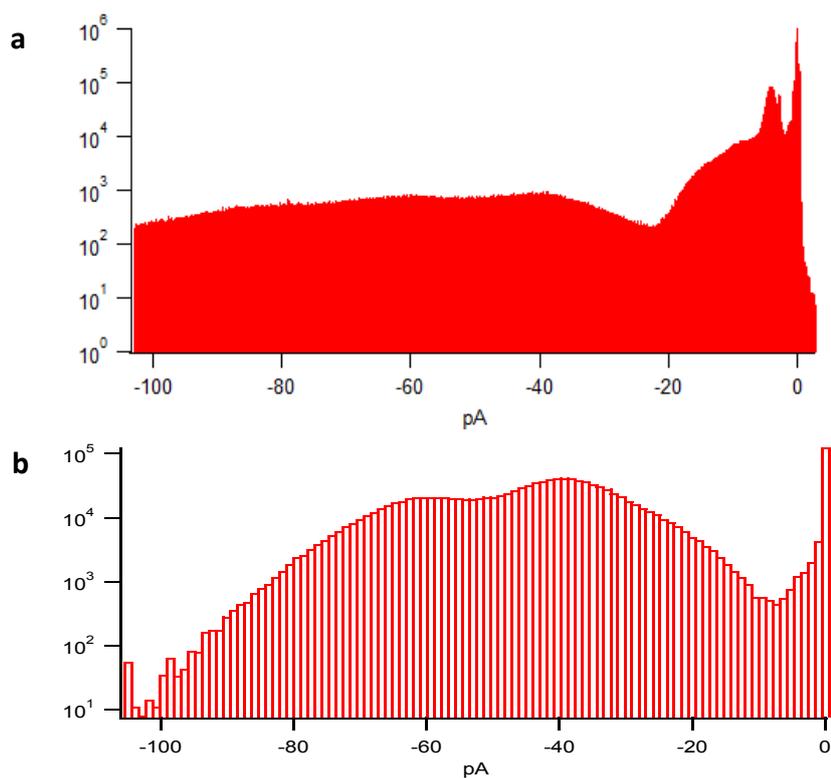


Figure IV.7 : Les histogrammes des traces présentés à la figure IV.6 : a. pour le totale de l'enregistrement, b. pour le zoom présenté en b.

La figure IV.8 montre l'évolution du signal électrique pour une bicouche de capacité de 76 pF, correspondant à une épaisseur de 4,1 nm, formée en absence d'AMP. La stabilité de la bicouche lipidique a été testée et par la suite 1 μ g de polymère est ajouté (soit une concentration de 1 μ g d'AMP dans 1 ml d'électrolyte) et l'évolution est suivie pendant une heure. Des courants autour de -25 pA apparaissent et quelques pics autour de -50 pA (figure IV.8.a). Ensuite, 1 μ g supplémentaire a été ajouté dans le même compartiment (anodique), la concentration est donc de 2 μ g/ml. L'évolution du signal a été suivie pendant encore 1 heure (figure IV.8.b).

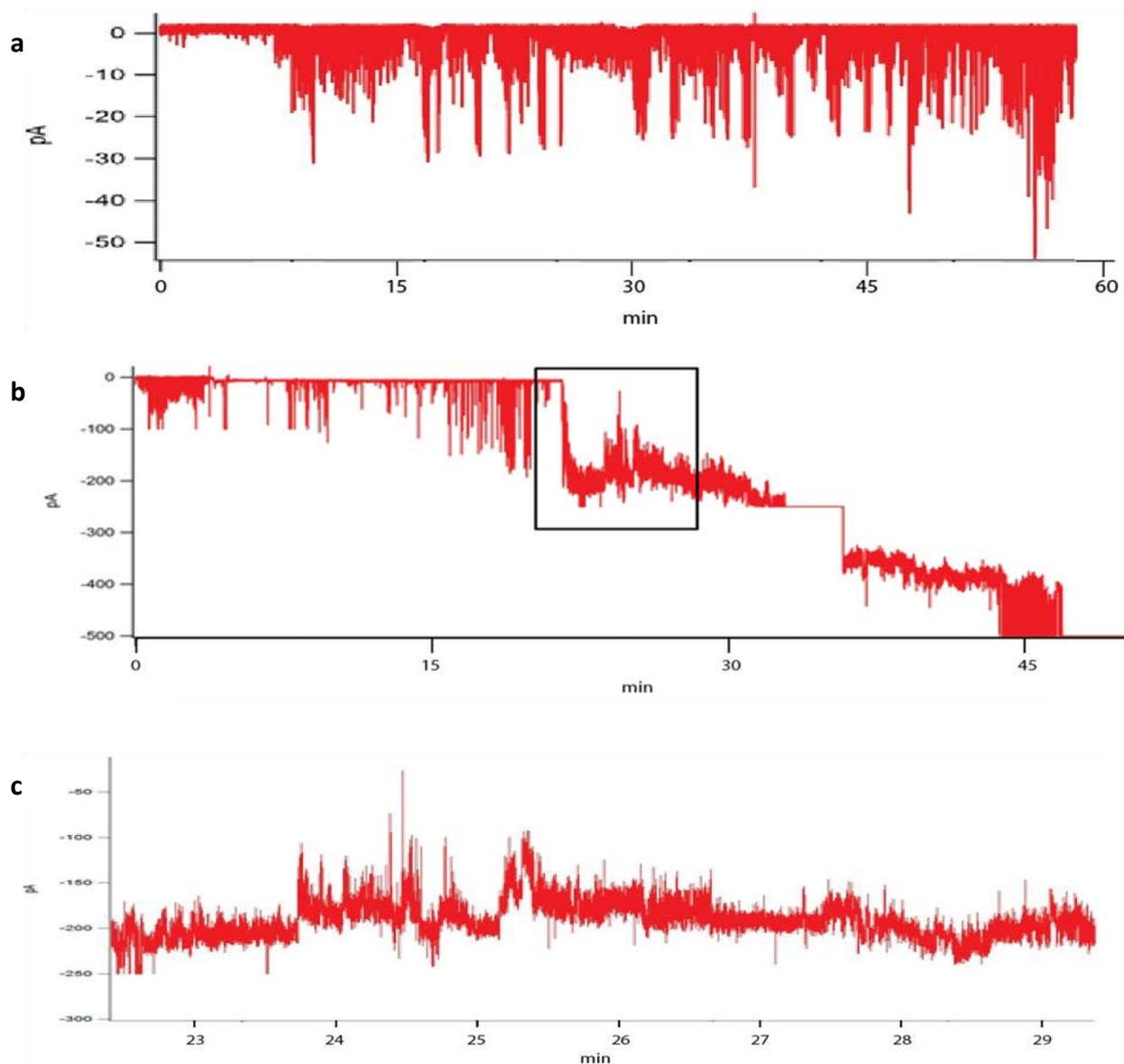


Figure IV.8 : **a :** Trace électrique obtenue sur une bicouche de 49 pF en présence de *trans*-AMP (1µg/ml dans le compartiment anodique) – ajout au temps $t = 0$ min – tension appliquée -100mV. **b :** l'évolution du signal après l'ajout du 2^e µg d'AMP (signal saturé autour de 2000 s), **c :** un zoom de la figure b (partie encadrée du b).

En regardant plus en détail le chronoampérogramme obtenu, des pas de courant peuvent être distingués - c'est-à-dire des valeurs majoritaires – ainsi que des valeurs intermédiaires entre les deux (figure IV.8.c). Plus concrètement, sur la figure IV.9.a, deux valeurs majoritaires sont -150 et -185 pA, mais il y a aussi la valeur -170 pA, qui apparaît comme un pas d' « hésitation » entre les deux (ces valeurs sont indiquées par des lignes horizontales).

L'histogramme d'occurrence des valeurs de courant apparaissant dans l'enregistrement est tracé figure IV.9.b. L'échelle utilisée pour cet histogramme est une échelle logarithmique.

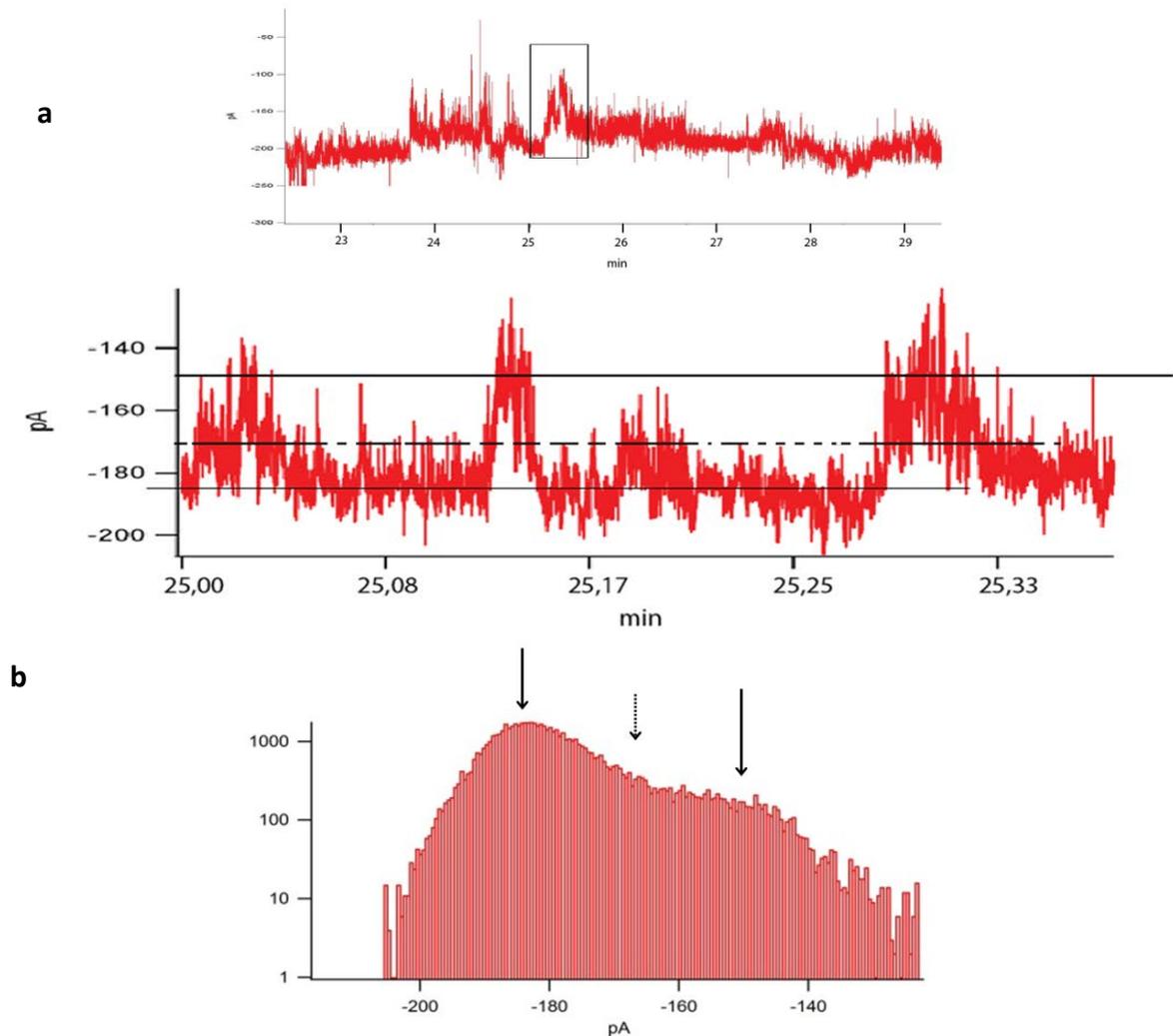


Figure IV.9 : **a** : zoom de la partie encadrée sur figure IV.8.c. Des valeurs majoritaires apparaissent. **b** : l'histogramme de fréquence des valeurs de courant.

Dans le but d'avoir une vision plus claire de l'effet de la concentration de l'AMP sur son insertion dans la bicouche, des expériences ont été réalisées dans lesquelles la concentration du polymère a été augmentée de manière graduelle. La figure IV.10 montre l'évolution du signal pour une bicouche après l'ajout du polymère dont la concentration dans le compartiment varie de 1 à 4 $\mu\text{g/ml}$. La bicouche est formée en absence d'AMP, sa stabilité a été vérifiée avant l'ajout du polymère et sa capacité est de 59 pF (5,3 nm).

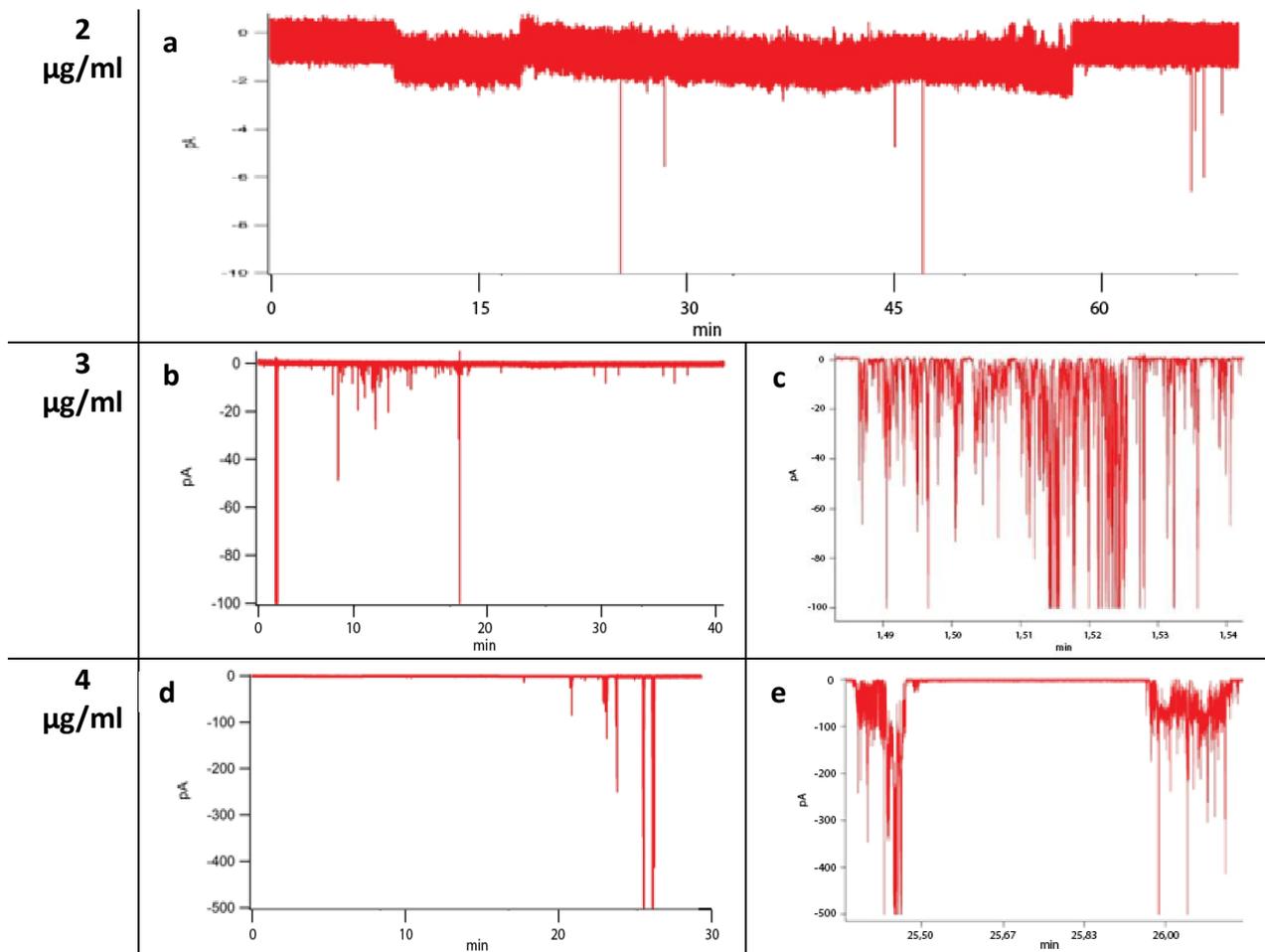


Figure IV.10 : Traces électrique obtenues sur une bicouche de 59 pF en présence de trans-AMP (différentes concentrations) – tension appliquée -100mV. Pour 1 et 2 µg/ml, aucune perturbation importante n’a été enregistrée (courant pour la concentration de 2 µg/ml montré en **a**), alors que pour 3 et 4 µg/ml des courants importants apparaissent (**b** : 3 µg/ml, **d** : 4 µg/ml). Des zooms pour ces deux concentrations sont donnés figures **c** (3 µg/ml) et **e** (4 µg/ml).

Dans le cas montré ici, les concentrations de 1 et 2 µg/ml (figure IV.10.a) ne provoquent pas de perturbations importantes de la membrane. Cependant, à l’ajout du 3^e (figure IV.10.b) et du 4^e µg (figure IV.10.d), la membrane est très perturbée.

Pour la concentration de 3 µg/ml des courants importants apparaissent, un peu inférieurs à -100 pA (l’interface graphique sature à -100 pA). Un agrandissement est montré figure IV.10.c. Pour la concentration de 4 µg/ml, le courant dépasse même les -500 pA, mais revient cependant à sa ligne de base, ce qui montre que la bicouche n’est pas « détruite ». Là aussi, un agrandissement est montré (figure IV.10.e). Cette fois-ci, on voit que le signal reste plutôt stable pendant plus longues durées.

- Bicouches formées en présence du *trans* - AMP

Dans le protocole expérimental utilisé dans les expériences décrites ci-dessus, l'ajout de l'AMP correspond à l'ajout de 1 à 4 μl dans 1ml de solution d'électrolyte, ce qui correspond à une dilution importante. Il est, donc, difficile de connaître la concentration d'AMP au voisinage du film, qui dépend du temps de diffusion de ce dernier et de l'endroit où il a été injecté dans le compartiment ; cela nécessiterait d'homogénéiser. Cependant, la bicouche suspendue est dans un état métastable et ne supporterait pas les perturbations nécessaires à cette homogénéisation.

Pour pallier cet inconvénient, nous avons utilisé un autre protocole dans lequel l'AMP est présent à une concentration homogène dans le compartiment anodique, avant la fabrication de la bicouche. L'idée est que la bicouche est ainsi formée en présence d'une concentration connue d'AMP et a priori avec une quantité d'AMP inséré dedans. L'inconvénient dans ce cas-là est que la composition, la stabilité et l'intégrité de la bicouche ne peuvent être vérifiées au début de l'expérience. Ainsi, pour ces expériences, il faut garder en tête que ce qui est suivi n'est peut-être pas toujours uniquement dû à l'effet de l'AMP.

La figure IV.11.a représente le chronoampérogramme pour une bicouche dont la capacité est 85 pF (soit une épaisseur de 3,7 nm) formée en présence du *trans* - AMP (avec une concentration finale dans le compartiment de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Des perturbations très importantes apparaissent, le courant va jusqu'au -40 pA. Cependant, ni à cette échelle, ni en zoomant (figures IV.11.b et IV.11.c), il n'est possible de distinguer des valeurs des courants majoritaires ; ce qui est confirmé aussi par l'histogramme de fréquence montré figure IV.11.d : même si de petits pics peuvent éventuellement être distingués, autour de -5, de -18 ou de -32 pA par exemple, il faut tenir en compte du fait que leur fréquence n'est pas vraiment importante (inférieure à 50) par rapport aux fréquences des autres valeurs.

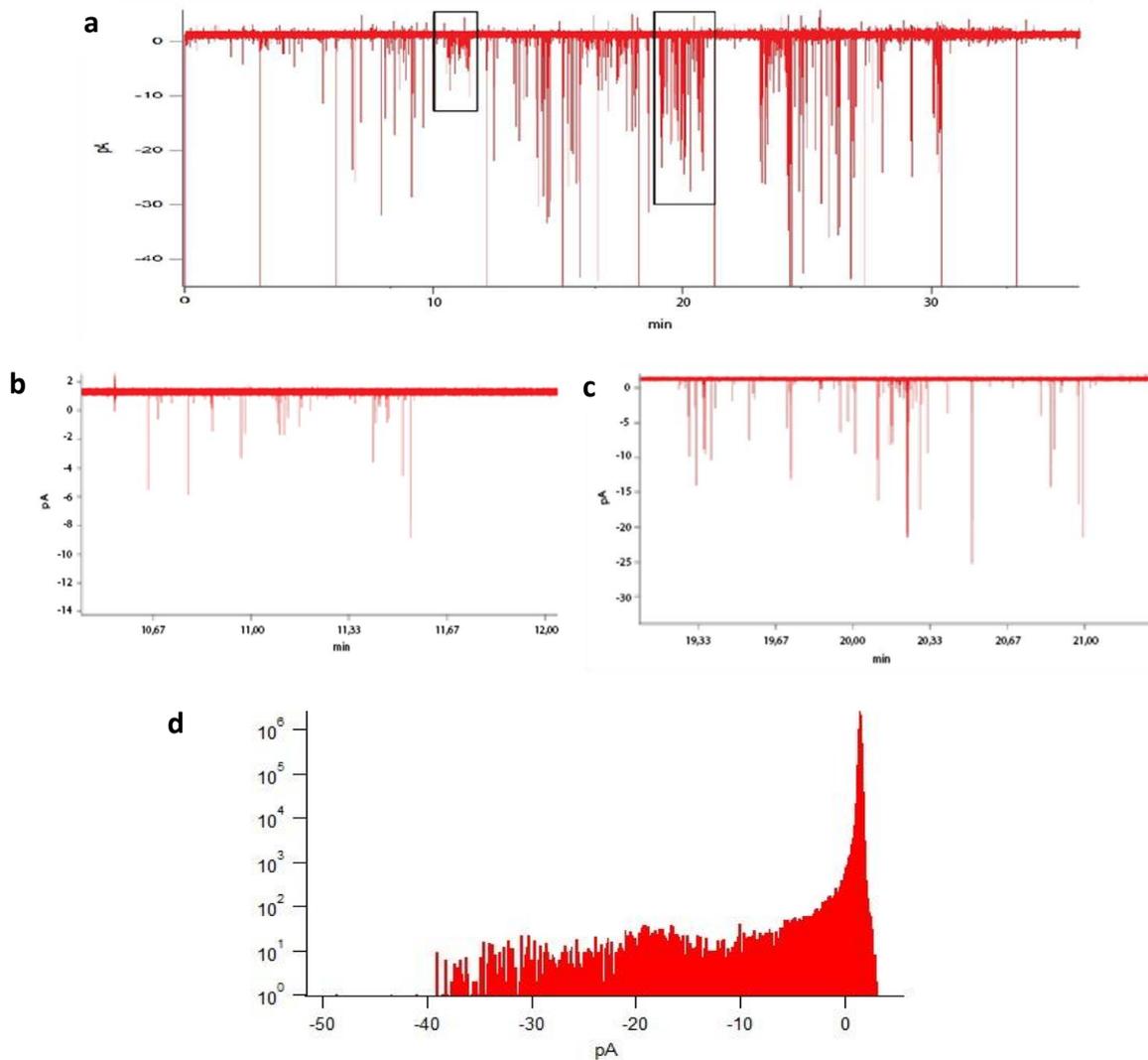


Figure IV.11 : Trace électrique obtenue sur une bicouche de 85 pF en présence de *trans* - AMP ($1\mu\text{g/ml}$ dans le compartiment anodique) – bicouche fabriquée en présence du *trans* - AMP – tension appliquée -100mV . **a** : la trace totale, **b** et **c** : des zooms de la trace et **d** : l’histogramme de fréquence pour cette bicouche.

La membrane dont la trace est montrée figure IV.12.a a été fabriquée en présence de $1\mu\text{g}$ d’AMP dans 1ml d’électrolyte. Sa capacité est de 60pF , ce qui correspond à $5,2\text{nm}$ d’épaisseur.

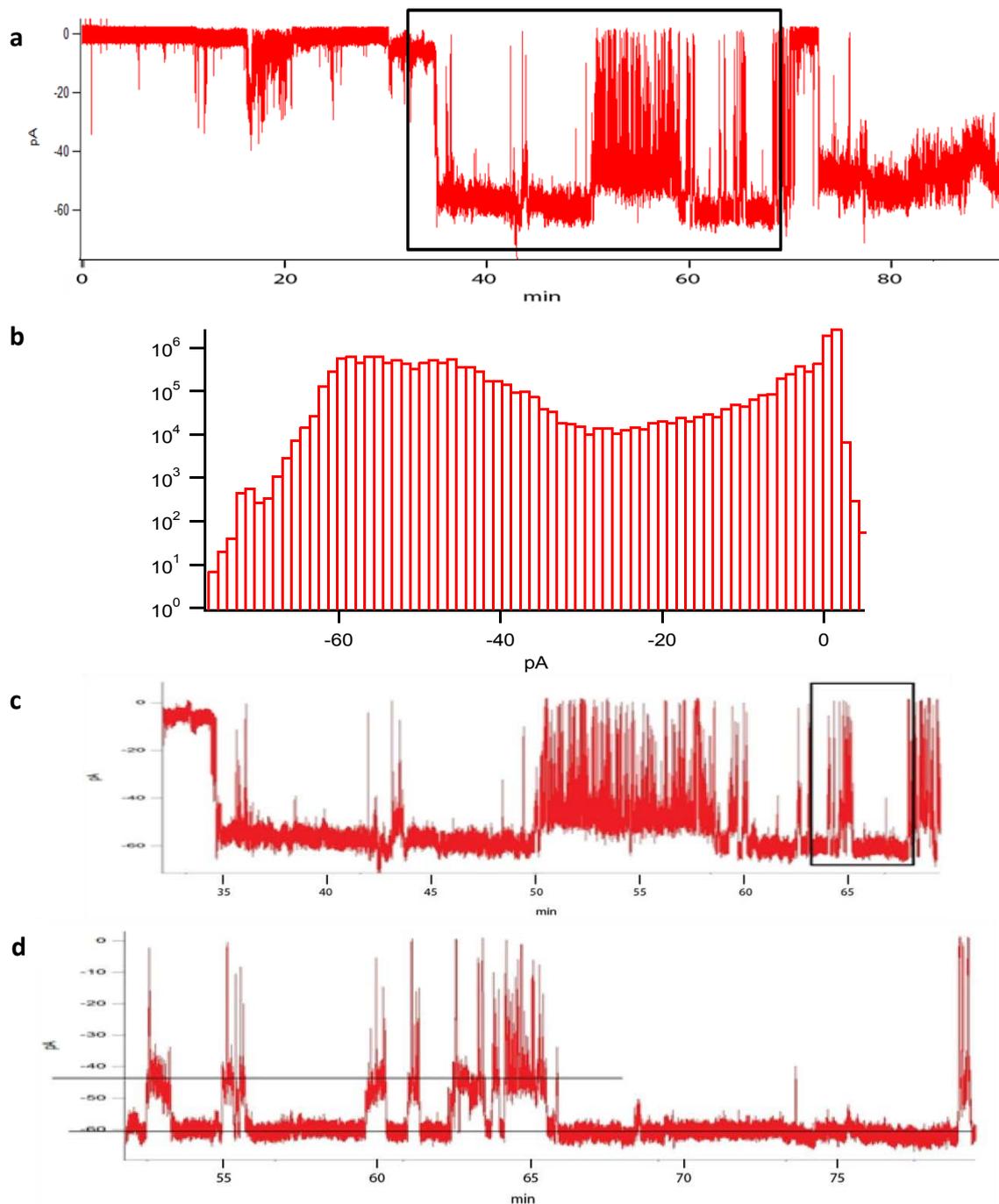


Figure IV.12 : Trace électrique obtenue sur une bicouche de 60 pF en présence de *trans*-AMP ($1\mu\text{g/ml}$ dans le compartiment anodique) – bicouche fabriquée en présence du *trans*-AMP – tension appliquée -100mV. **a :** la trace totale de la bicouche, **b :** l’histogramme de fréquence de la trace, **c :** le zoom de la partie encadrée du a, **d :** le zoom de la partie encadrée au c. Deux valeurs majoritaires de courant sont distinguées et notées par deux lignes horizontales.

L'enregistrement complet (1,5 heures) de la bicouche (figure IV.12.a) fait apparaître deux parties où le comportement de la membrane est différent : la première demi heure (jusqu'à 2000 secondes) et la seconde partie. Durant la première partie, la bicouche est perturbée,

mais le courant oscille sans qu'aucune valeur particulière ne soit dominante. La durée des événements est significative (apparition d'un courant pendant plus de 1ms) mais le courant redevient nul (retour à la ligne de base) assez rapidement. En revanche, après une trentaine de minutes, le courant, non nul, reste à peu près stable pendant plus de 10 minutes, laissant supposer qu'une ou plusieurs structures de perméation ont été créées et stabilisées. Dans cette partie, le courant rejoint parfois la ligne de base pendant quelques secondes mais ne reste jamais longtemps. D'ailleurs, les fluctuations observées pendant cette deuxième partie révèlent un état plus stable et un état moins stable : le signal fluctue de manière beaucoup plus importante et est beaucoup plus bruité quand il se trouve au palier d'environ -45 pA et non au palier stabilisé à peu près à -60 pA. Un zoom de la partie encadrée à la figure IV.12.a est montré figure IV.12.c. Ici aussi, comme pour les bicouches vues précédemment, des valeurs majoritaires de courant sont repérables sur le chronoampérogramme (encore plus zoomé figure IV.12.d où les valeurs majoritaires sont indiquées par des lignes horizontales), mais aussi même sur l'histogramme d'occurrence de tout l'enregistrement (figure IV.12.b).

NB. Les résultats présentés sont assez divers et avec des valeurs assez éloignées les unes des autres, contrairement à certains résultats qui peuvent être trouvés dans la littérature (Popot, Althoff et al. 2011; Laub, Witschas et al. 2012). Cependant ces derniers, obtenus de manière reproductible, permanente et sans grande fluctuation concernent des structures bien définies, rigides comme le sont par exemple les canaux artificiels à base de cyclodextrines (Badi, Auvray et al. 2009). Dans notre cas, la molécule étudiée étant un polymère – donc sans une structure secondaire précise, il n'est pas étonnant que les profils d'intensité de courant électrique obtenus soient très variés. Ce qui est intéressant ici est que, même dans le cas où les valeurs de courant obtenues sont très différentes, les comportements du signal sont, le plus souvent, similaires.

D'autres résultats, pour des membranes présentant le même comportement, mais dont les signaux détectés sont de différents ordres de grandeur sont présentés annexe 1.

IV.2.b. AMP ajouté en conformation *cis*-AMP

Le même type d'expériences a été réalisé avec l'AMP en conformation *cis*-AMP.

La figure IV.13 montre le chronoampéromètre pour une bicouche de capacité 55 pF (5,7 nm d'épaisseur), formée en présence de *cis*-AMP (1 µg/ml). Le courant reste nul pendant à peu près 85 minutes.

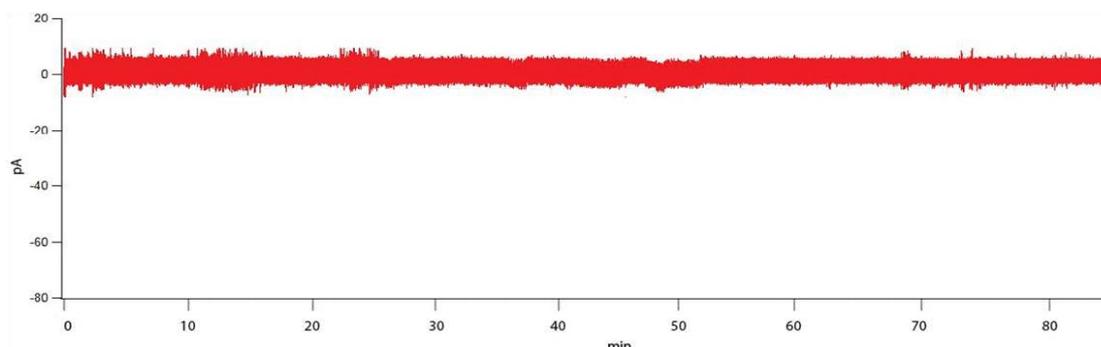


Figure IV.13 : Trace électrique obtenue sur une bicouche de 55 pF en présence de *cis* - AMP (1µg/ml dans le compartiment anodique) – bicouche fabriquée en présence du *cis* - AMP – tension appliquée -100mV.

La figure IV.14 montre l'évolution du signal d'une bicouche formée en absence d'AMP de capacité 50 pF (6,2 nm d'épaisseur) à partir du moment où 2 µg de *cis* - AMP ont été ajoutés dans le compartiment anodique (après vérification de la stabilité de la membrane). Le courant reste nul durant environ 1 heure après l'ajout de l'AMP et ensuite la bicouche est perturbée et finalement « cassée » (66 minutes après l'ajout du *cis* - AMP).

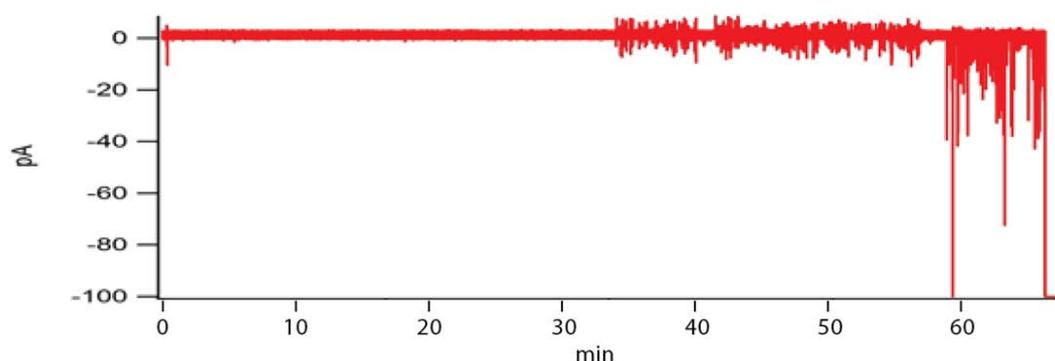


Figure IV.14 : Trace électrique obtenue sur une bicouche de 50 pF en présence de *cis* - AMP (2µg/ml dans le compartiment anodique) – ajout au temps t = 0 min – tension appliquée - 100mV.

Il faut noter ici que les perturbations qui apparaissent après la première demi-heure ne sont pas dues à l'action du polymère, mais plutôt à des sources électromagnétiques. Le fait que la perturbation soit symétrique par rapport à la ligne de base montre que la bicouche reste stable et toujours imperméable. La membrane se perméabilise une heure après l'ajout de l'AMP.

La perméabilisation de la bicouche apparaissant après l'ajout du *cis*-AMP peut être due à la relaxation spontanée du polymère. En effet, l'état relaxé de l'AMP est la conformation *trans*. Malgré le fait que le temps nécessaire à la relaxation du polymère soit de l'ordre de 3 heures (Sebai, Cribier *et al.* 2010), il est incontestable que le basculement ne se passe pas de manière instantanée et simultanée ; on pourrait donc imaginer que la perméabilisation de la bicouche montrée figure IV.14 est (au moins partiellement) due au changement de conformation de l'AMP (de *cis* en *trans*). Rappelons le fait que pour presque toutes les autres bicouches perméabilisées dans lesquelles du *trans*-AMP a été ajouté, la perméabilisation a été observée bien avant une heure.

IV.2.c. Le basculement entre *cis* - AMP et *trans* - AMP

Une autre approche a consisté à provoquer le basculement d'une conformation de l'AMP à l'autre alors que celui-ci était déjà inséré dans la membrane. Dans ce but, la cage de Faraday a dû être modifiée de façon à permettre l'illumination des AMP insérés dans la bicouche au cours de l'expérience. Un petit trou (de diamètre plus faible que l'épaisseur, afin de garder les propriétés d'isolement de la cage Faraday) a été fait dans le couvercle de la cage Faraday à l'aplomb de la bicouche (figure IV.15). Selon l'illumination souhaitée, une lampe UV (basculement ou maintien en *cis*) ou une source de lumière blanche (basculement en *trans*) est placée juste au dessus de la fenêtre percée.

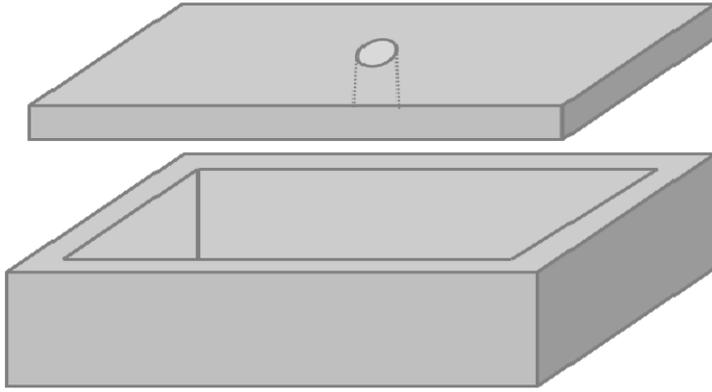


Figure IV.15 : La cage Faraday a été percée de manière à ce que les interférences avec des signaux électromagnétiques provenant de l'extérieur soient éliminées.

- **Basculement *trans* vers *cis* - AMP**

La bicouche dont le signal est suivi figure IV.16.a est une bicouche formée en présence d'AMP (2 $\mu\text{g/ml}$) en conformation *trans*. La lampe UV a été ensuite posée au dessus de la cage Faraday, de manière à ce que le tout soit illuminé en permanence, dans le but de faire basculer le polymère en conformation *cis*.

L'analyse du chronoampérogramme montre que la bicouche est perméabilisée de manière assez stable et rien n'indique un changement de comportement de la bicouche qui correspondrait à un changement de conformation du polymère. Un agrandissement de la zone encadrée figure a, permet de mettre en évidence des valeurs de courant majoritaires (indiquées à l'aide des lignes horizontales sur la figure IV.16.b).

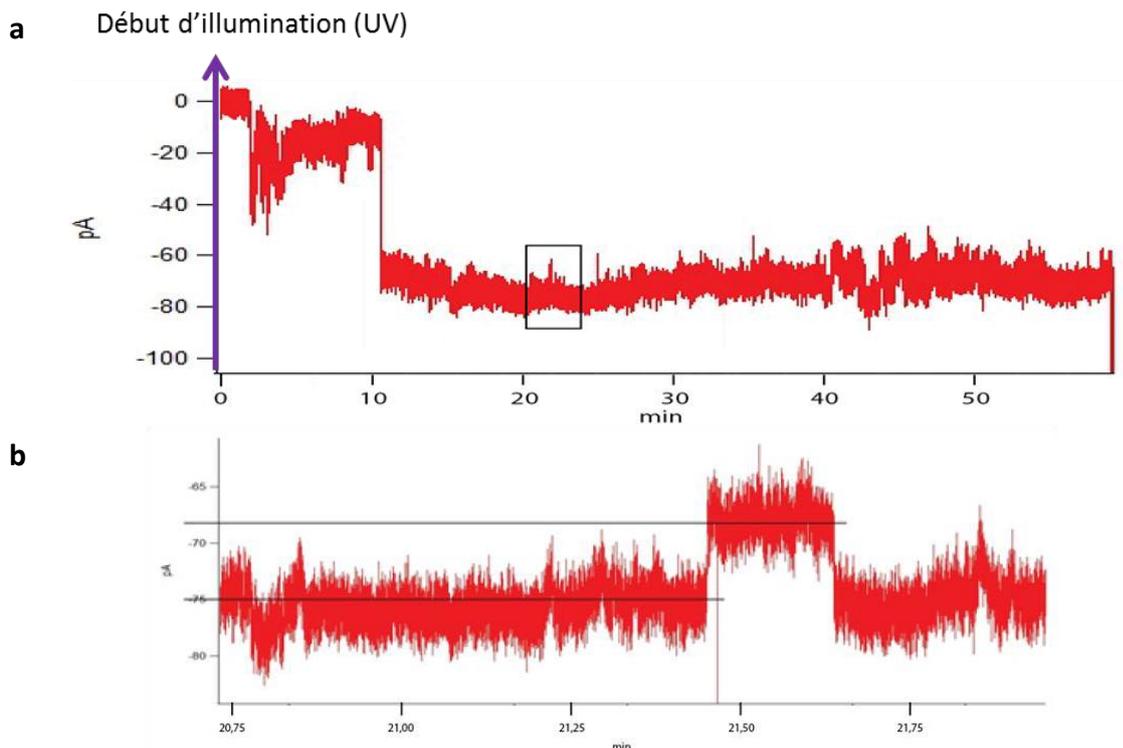


Figure IV.16 : **a** : trace électrique d'une bicouche de 75 pF (4,1 nm) formée en présence de 2 μg de *trans* - AMP dans 1 ml d'électrolyte – tension appliquée -100 mV. La bicouche, après sa formation a été illuminée en UV pour voir l'effet du changement de conformation, mais aucune indication de changement de comportement n'a été détectée. **b**: en zoomant plus, des valeurs de courant majoritaires peuvent être distinguées à l'œil (indiquées à l'aide des lignes horizontales).

- **Basculement *cis* vers *trans* vers *cis* - AMP**

La bicouche de la figure IV.17 a été formée en absence d'AMP et sa capacité est de 45 pF (7 nm d'épaisseur). 3 μg d'AMP ont été ajoutés (toujours dans 1 ml d'électrolyte), le polymère étant en conformation *cis* – AMP et la lampe (lumière blanche) posée par dessus pour basculer en conformation *trans* – AMP, dès le début de l'expérience. La membrane est perturbée dès le début et se perméabilise environ 30 minutes plus tard. Comme il est constaté des zooms présentés aux figures IV.17.b et IV.17.d, ainsi que par les populations de l'histogramme de l'enregistrement total (montré figure IV.17.c), il existe des valeurs majoritaires. Les valeurs majoritaires sont indiquées avec des flèches verticales sur l'histogramme d'occurrence et avec des lignes horizontales sur le zoom du chronoampérogramme de la figure IV.17.d.

Une fois le signal stabilisé et la bicouche perméable, la lumière blanche a été remplacée par la lampe UV, afin de rebasculer le polymère en conformation *cis* – AMP et de voir l'effet sur

la bicouche. Le changement de conformation n'a eu aucun effet détectable par nos mesures et la membrane est restée perméable jusqu'à la fin de la manipulation (environ 2 heures supplémentaires).

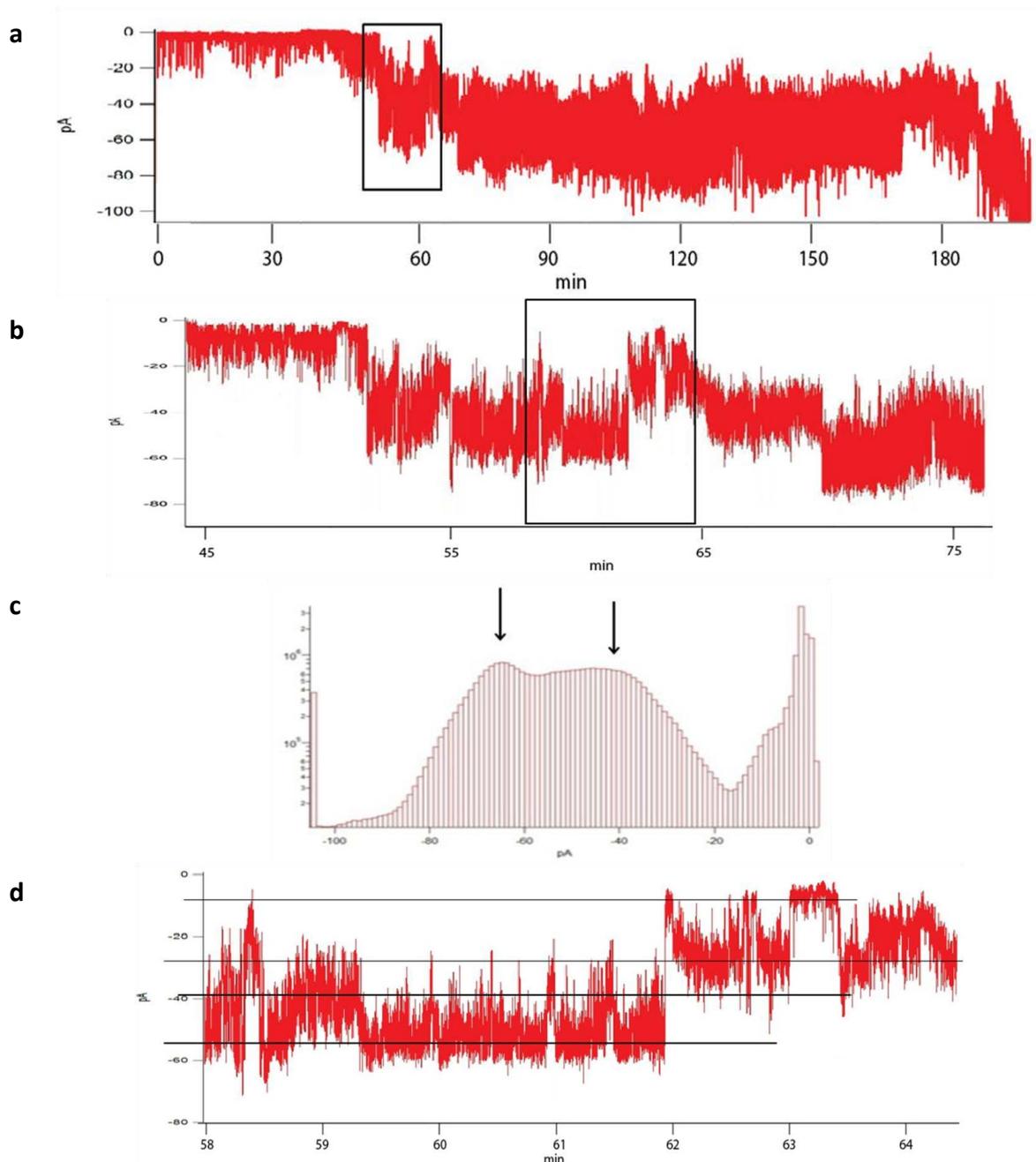


Figure IV.17 : **a :** trace électrique obtenue sur une bicouche de 45 pF en présence de *cis* - AMP illuminé en lumière blanche pour passer en conformation *trans* - AMP (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans le compartiment anodique) – bicouche fabriquée en présence du *cis* - AMP – tension appliquée - 100mV. La bicouche est initialement perturbée et elle se perméabilise de manière plus stable 30 minutes plus tard. **b :** Un zoom sur le moment de la perméabilisation de la bicouche (partie encadrée à a), **c :** l'histogramme d'occurrence de la partie zoomée et **d :** un instantané après la perméabilisation de la membrane zoomé. Des valeurs majoritaires de courant sont facilement distinguées (indiquées à l'aide des lignes horizontales).

La bicouche dont la trace est montrée à la figure IV.18.a est formée en présence de 3 μg de *trans* – AMP dans 1 ml d'électrolyte et est immédiatement illuminée en UV (capacité 74 pF). Cependant, au bout de 15 minutes des perturbations stables apparaissent, similaires à celles observées quand l'AMP est ajouté en conformation *trans*. Au bout de 24 minutes total (9 minutes après la perméabilisation) l'éclairage est basculé en lumière blanche, mais on ne voit aucune indication que l'illumination change l'évolution du signal, étant donné que la dernière semble assez « lisse ». Un zoom de la zone encadrée est montré figure IV.18.b.

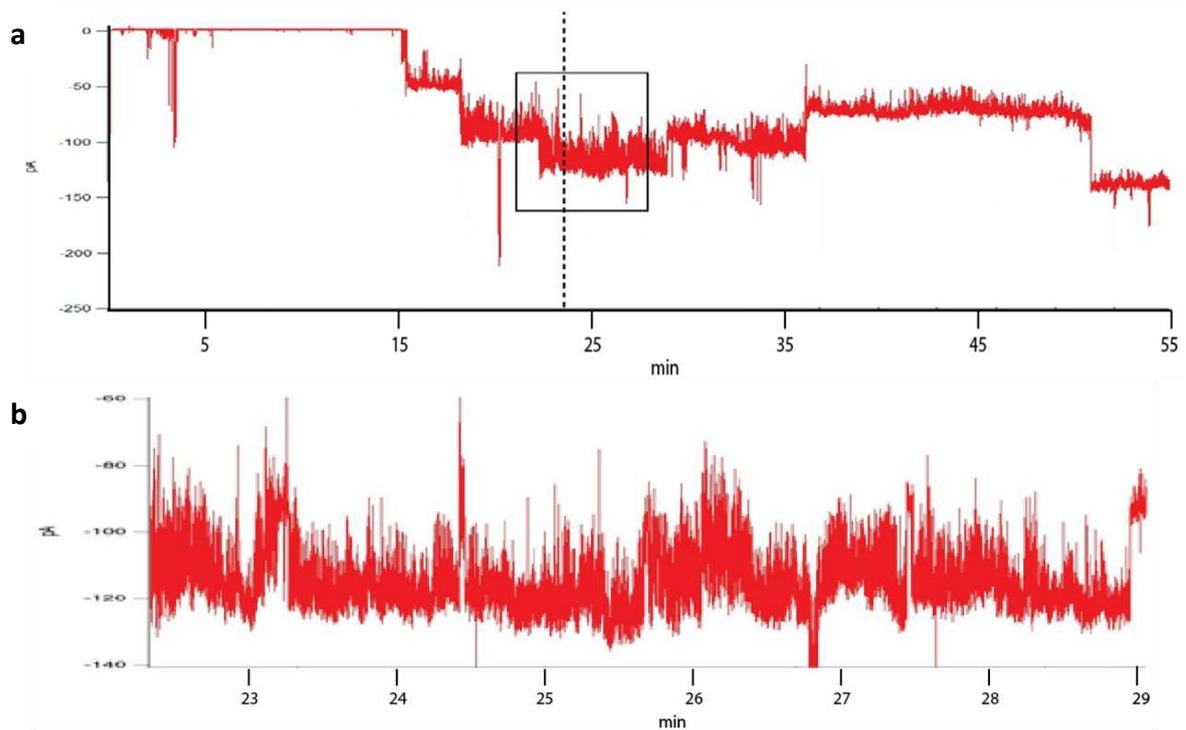


Figure IV.18 : **a** : trace électrique obtenue sur une bicouche de 74 pF en présence de *trans* – AMP (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans le compartiment anodique) illuminé en UV pour passer en conformation *cis* (temps 0 à 23 min) et ensuite illuminé en lumière blanche (temps 23 min - fin) – bicouche fabriquée en présence du *trans* - AMP – tension appliquée -100mV (le changement d'illumination est indiqué par une ligne pointillée verticale), **b** : zoom de la partie encadrée en a.

IV.2.d. Discussion

L'ensemble des résultats présentés jusqu'à ce point indique que le 15C8 10azo en conformation *trans* joue systématiquement un rôle perméabilisateur. En revanche, en conformation *cis* il ne perméabilise presque jamais la bicouche formée - même si parfois il la perturbe.

La taille des ions (K^+ ou Cl^-), dont le passage est détecté est si petite que l'hypothèse de formation des structures de perméation non détectables peut être rejetée. Quand l'AMP est préalablement en conformation *cis* - AMP et que la cage Faraday est illuminée en lumière blanche (contenant donc les longueurs d'onde autour de 436 nm), assez souvent, à cette illumination suit la perméabilisation (ou au moins la déstabilisation) de la membrane.

- **La diversité des résultats**

L'ensemble des observations rapportées ci - dessus fait clairement apparaître que le *trans* - AMP, ainsi que le basculement de la conformation *cis* vers la conformation *trans*, ont un effet perméabilisant sur les films lipidiques, mais que les courants attribués aux structures de perméation créées ont des valeurs couvrant plus d'un ordre de grandeur. Les paramètres de l'environnement, comme l'humidité ou la température de la pièce dans laquelle les expériences ont lieu n'ont pas varié de manière importante et ne peuvent être a priori invoqués pour expliquer de telles variations. Les caractéristiques de la bicouche formée ne sont jamais exactement les mêmes ; cependant, les différences entre les bicouches formées, comme la différence de capacité, ne sont jamais très importantes puisqu'une attention particulière a été portée afin de rester dans une gamme de valeurs acceptables et qui miment correctement la membrane plasmique. L'origine de ces variations doit donc être cherchée ailleurs...

La diversité des signaux obtenus ne semble pas être liée à la concentration imposée, au moins dans la gamme de concentrations utilisées pendant nos expériences, étant donné que pour les mêmes concentrations d'AMP des signaux de différents ordres de ont été mesurés. Il faut, tout de même, garder en tête que la concentration estimée ne correspond pas forcément à la concentration réelle au voisinage de la membrane, à cause des faibles

concentrations ainsi que du petit diamètre du trou dans lequel la bicouche est formée. D'ailleurs, pour une membrane unique étudiée l'augmentation de la concentration connue semble affecter la taille de la structure de perméation.

- **Homogénéité des résultats : des données sur les structures de perméation ?**

Même si les valeurs d'intensité du courant électrique peuvent varier (et parfois de manière importante) d'une expérience à l'autre, il y a des caractéristiques communes. Par exemple, les profils des traces sont similaires, ce qui voudrait dire que la perméabilisation de la bicouche est à chaque fois provoquée par un mécanisme similaire, indépendamment du taux de perméabilisation.

Une question se pose : est-ce que ce comportement est similaire parce qu'il s'agit du même mécanisme donnant des perméabilisations plus ou moins grandes ? Ou bien s'agit-il d'un même processus (courant fixe) qui se produit plusieurs fois ? Dans cette seconde hypothèse, la répétition du même phénomène et la création de plusieurs structures de perméation identiques entre elles, on devrait trouver dans les chronoampérogrammes plusieurs pas de courant, égaux et repartis dans le temps de manière indépendante – ce qui n'est pas le cas. On doit, donc, supposer que toutes les structures de perméation - identiques entre elles - sont créées simultanément et ont besoin du même délai pour se stabiliser et/ou pour se refermer. Mis à part le fait qu'une telle hypothèse ne prend pas en compte les écarts que l'on devrait avoir (même dans le niveau des erreurs statistiques), il est clair dans nos expériences que les structures de perméation commencent à se former à des instants différents et qu'il n'y a pas un délai défini pour leur création : en effet, aucun temps d'interaction entre l'AMP et la membrane, nécessaire à la perméabilisation n'a été mis en évidence dans nos expériences pour les concentrations utilisées. La première hypothèse envisageable est donc plus réaliste : il doit y avoir déclenchement du même phénomène, mais à différentes échelles ; ces différences pouvant être dues à la quantité de polymère inséré dans la bicouche ou présent à côté du point où la bicouche se perméabilise. Cela n'exclut *a priori* pas totalement la possibilité d'avoir plusieurs structures de perméation dans la même bicouche.

Nos résultats ne nous permettent donc pas de définir un courant unitaire qui serait relié à la création d'une structure de perméation fixe, étant donné qu'il n'y a pas une valeur de courant qui soit répétée, même en se restreignant à l'étude d'une seule bicouche. Nous sommes plutôt amenés à la conclusion que les structures de perméation provoquées par l'interaction du *trans* – AMP avec la bicouche lipidique peuvent être de tailles très variées.

- **Durée de vie et fermeture des structures de perméation**

Concernant la durée de vie de structures de perméation, elle ne semble pas pouvoir être contrôlée. Il n'y a pas de durée caractéristique, ni minimale, ni maximale. En effet, même dans le cas des bicouches qui se rompent après leur perméabilisation, l'accumulation de l'AMP semble provoquer la rupture de la membrane, même si des ruptures des BLM sont classiquement observées. Étant donné que la rupture n'a pas lieu après des signaux graduellement plus importants, cette question reste encore ouverte. Cependant, par rapport à la durée de vie des structures de perméation, il semble que les ouvertures de plus grande taille ont tendance à rester ouverte de manière permanente plus souvent de celles qui donnent de signaux plus faibles.

Un des buts de ce travail était de contrôler par l'éclairement non seulement la création de structure(s) de perméation mais aussi en suite leur fermeture en provoquant avec un flash UV le basculement en *cis* - du polymère donc *a priori* non perméabilisant. Les expériences réalisées en BLM n'ont pas permis de faire cela, elles ont au contraire montré que le contrôle de la fermeture des structures de perméation n'est pas réussi. Effectivement, une fois que le film lipidique est perméabilisé (l'AMP étant initialement en conformation *trans*), l'illumination en UV qui *a priori* fait basculer l'AMP dans sa conformation *cis* n'a pas d'effet observable sur la ou les structures créée(s) : l'évolution du signal n'est pas modifiée par l'illumination UV.

- **Les fluctuations du courant**

La plupart des traces enregistrées font apparaître des valeurs majoritaires du courant entre lesquelles le signal fluctue. En regardant de plus près ces sauts de courant, un autre phénomène peut être observé : les deux "états" entre lesquels le courant oscille n'ont pas la même stabilité. Assez souvent on retrouve sur les traces obtenues des « régions » de comportement différent : une première situation est le cas de deux parties de trace distinctes. Pendant la première partie il y a une « hésitation » ; des fluctuations entre l'état imperméable et un état perméable (des signaux de courants non nuls). Pendant la deuxième partie la membrane est perméabilisée de manière relativement stable. La deuxième situation, où des stabilités différentes peuvent être observées et qui parfois suit la première, est le cas d'un film lipidique perméable qui présente deux courants majoritaires entre lesquels il oscille (comme est le cas pour la bicouche présentée figure IV.12, représentée – séparée en deux parties - figure IV.19). Ces deux paliers (courants majoritaires) sont beaucoup moins écartés entre eux que de l'état non perméable. De plus, un des deux courants domine et est moins bruité, l'autre courant présentant, au contraire, des fluctuations très importantes (retour à 0 dans l'exemple cité). Ceci pourrait correspondre à des oscillations entre un état perméable stable et un état, aussi perméable, mais beaucoup plus instable. Le premier type de fluctuations est montré à la partie gauche (1) de la figure IV.19.a et le deuxième à la partie droite (2) de la même figure (dont une partie zoomé figure IV.19.b). Les histogrammes des deux parties, ainsi que de la trace électrique complète sont donnés figure IV.20 (cette fois – ci en échelle linéaire, l'écart entre l'intensité des différents pics n'étant pas si importante). Ces types d' « hésitation » sont souvent rencontrés (voir les traces et les histogrammes déjà montrés dans le paragraphe IV.3. Des résultats supplémentaires sont donnés annexe 1.

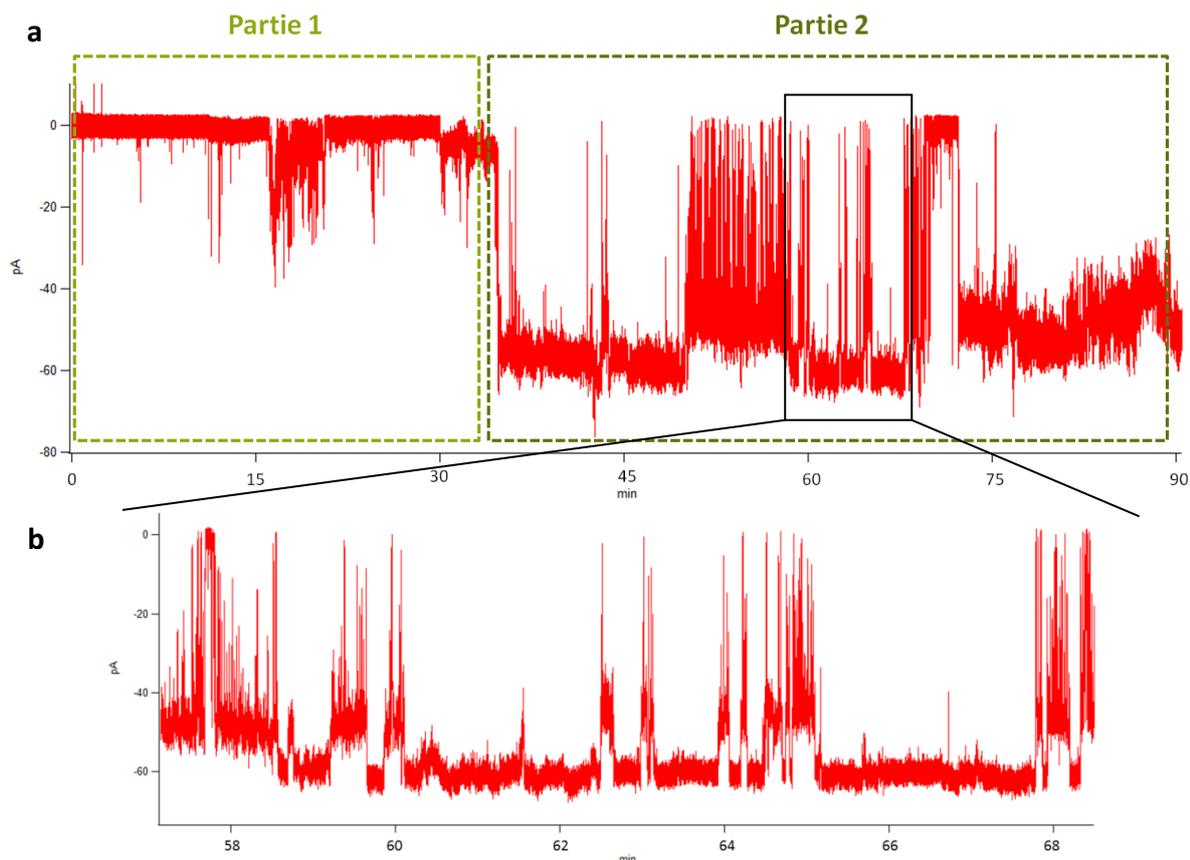


Figure IV.19 : Les deux types d'hésitation mentionnés pour la membrane déjà indiquée figure IV.12 (60 pF, bicouche fabriquée en présence du *trans* – AMP (1 μ g/ml) – tension appliquée - 100mV). **a.** les deux parties représentent l'état plutôt fermé et l'état plutôt ouvert de manière stable. Dans la première partie des fluctuations entre l'état fermé et des états perméabilisés sont claires. Dans la deuxième partie des fluctuations entre en état ouvert stable et un état ouvert instable peuvent être observées (zoom en **b**).

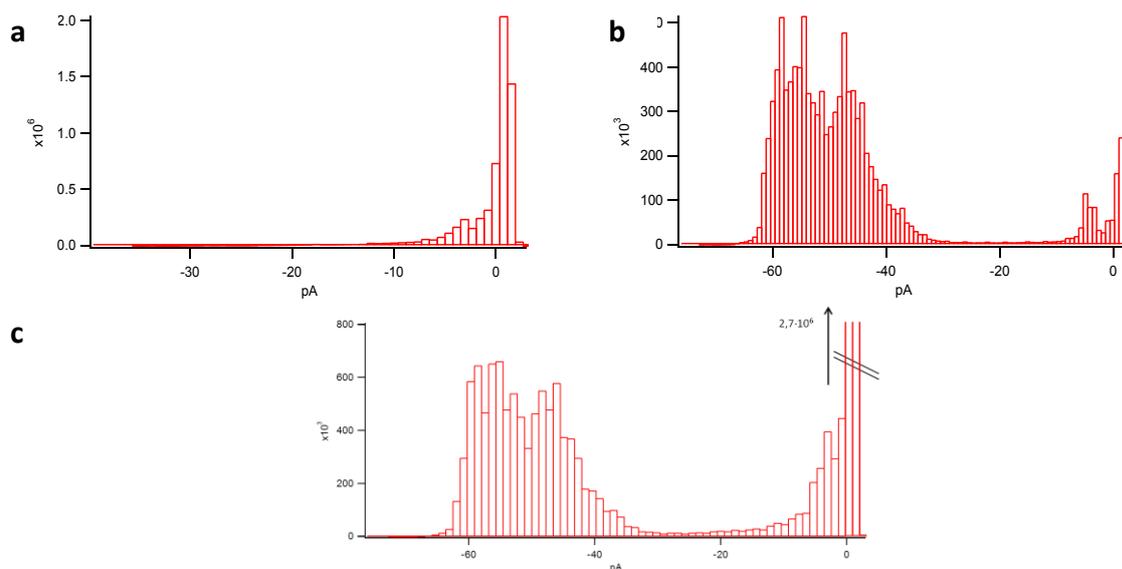


Figure 20 : **a :** l'histogramme de fréquence de la première partie de l'enregistrement (de 0 à 30 min), **b :** l'histogramme de la deuxième partie de l'enregistrement (de 30 min à la fin) et **c :** l'histogramme de fréquence pour la trace totale de la bicouche. Les valeurs majoritaires de la deuxième partie y sont distinguées.

Une question qui reste ouverte, sans pouvoir conclure de manière globale est le fait que certaines membranes retournent spontanément à un état non perméable. Cela semble être lié à la taille des structures de perméation, les structures plus petites se refermant plus souvent (ce qui pourrait aussi être vu comme encore une « hésitation » entre un état perméable plus stable et l'état non perméable, moins stable au début de ces fluctuations).

IV.3. Caractérisation des structures de perméation

IV.3.a. Nature des structures de perméation

Afin de pouvoir conclure sur la forme des structures de perméation créées par le *trans* – AMP, le signal obtenu pour une structure de perméation en fonction de la valeur de la tension appliquée a été étudié. En appliquant une gamme de tensions électriques de part et d'autre d'un film perméabilisé, les valeurs de l'intensité de courant sont mesurées, ce qui nous permet la vérification résistif de la membrane. Ces études sont réalisées sur des structures de perméation qui sont plutôt stable dans la gamme de tension appliquée pour éviter d'attribuer des éventuelles modifications du signal à un changement de la structure indépendant de la tension. Cette expérience a été mise en place pour des concentrations différentes d'AMP dans le compartiment anodique. Les résultats sont montrés figure IV.21.

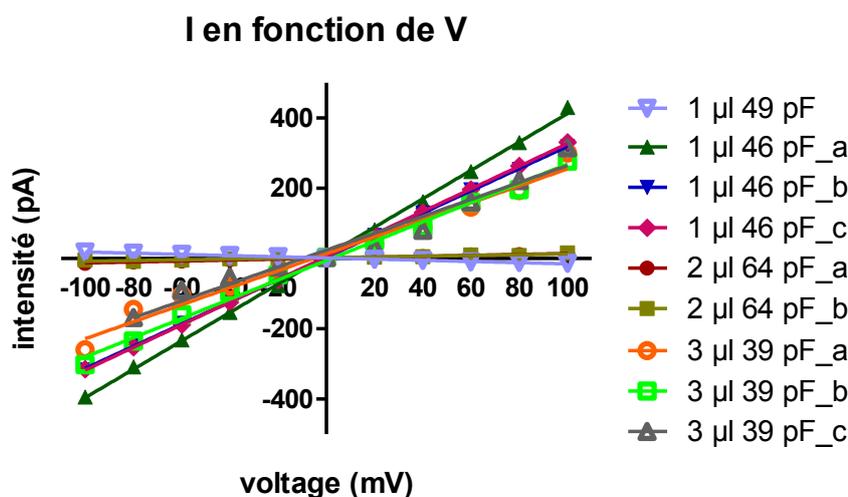


Figure IV.21 : En appliquant une « rampe » de tension (du -100 mV à +100 mV), l'intensité du courant électrique est mesurée et tracé en fonction de la tension appliquée (I (V)).

Comme il peut être constaté par les traces I(V) obtenues, les valeurs sont symétriques par rapport au point (0,0), indépendamment de leur pente et pour des tensions qui vont des -100 à +100 mV. Cette symétrie est la signature d'une symétrie des structures créées. Dans le cas des structures instables cette étude ne peut pas avoir lieu ; il est donc possible que les structures qui donnent lieu à des courants présentant de grandes variations ne soient pas symétriques. Par ailleurs, les pentes des droites sont très variables et aucune corrélation n'a pu être faite avec la concentration de l'AMP présente dans le compartiment.

IV.3.b. Taille des pores

Comme il a été expliqué au paragraphe IV.1, si la bicouche est considérée comme un condensateur, des données sur son épaisseur peuvent être obtenues (équation IV.1). Par la suite à la loi de Pouillet, le diamètre du pore peut être estimé.

$$D^2 = \frac{4 \cdot \rho \cdot e}{\pi \cdot R_p}, \quad \text{où } \rho \text{ la résistivité du KCl 1M (0,0894 } \Omega \cdot \text{m), } e \text{ l'épaisseur de la bicouche et } R \text{ la résistance de la membrane} \quad (\text{équation IV.4})$$

En utilisant alors les données obtenues, des estimations sur le diamètre des pores relativement stables sont obtenus. Ces diamètres ont été tracés en fonction de l'épaisseur de la membrane (figure IV.22.a), ainsi que en fonction de la concentration d'AMP ajouté dans le compartiment anodique (figure IV.22.b), afin d'étudier la possibilité de lier la taille des pores à ces paramètres. Comme il peut être constaté, aucune corrélation directe ni avec l'épaisseur de la membrane, ni avec la concentration de l'AMP n'est révélée.

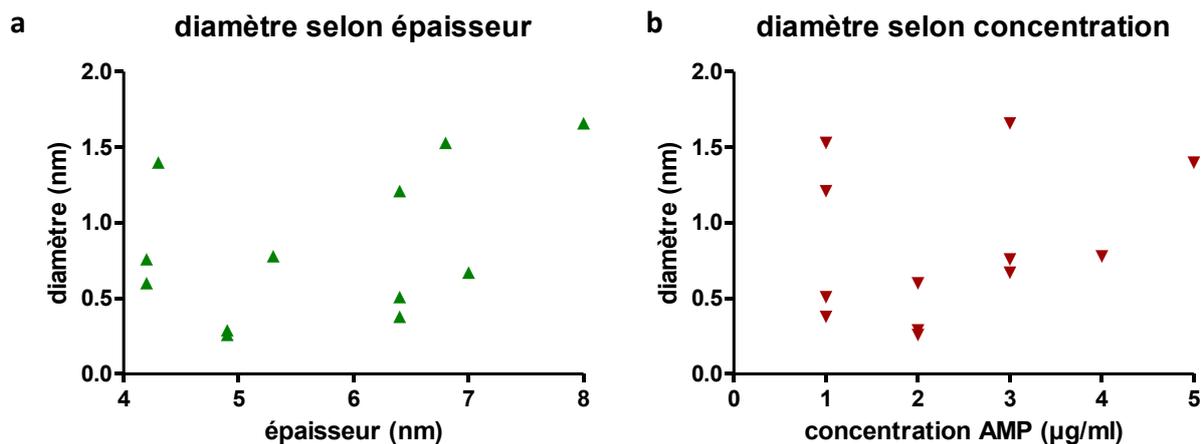


Figure IV.22 : Les diamètres estimés des pores en fonction de l'épaisseur des membranes **(a)** et en fonction de la concentration d'AMP dans le compartiment anodique **(b)**.

IV.4. Conclusion et discussion : sur les pas d'un mécanisme de perméabilisation...

Pour conclure, une hypothèse qui semble compatible avec les données expérimentales est celle où l'AMP, indépendamment de sa conformation, se lie dans la membrane dès son contact avec elle. Dans le cas de la conformation *cis*, le taux d'insertion n'est *a priori* pas suffisant pour perméabiliser la membrane (au moins pour des ratios d'AMP/lipides 0,1/1 g). Étant donné son faible taux d'hydrophobicité il est probablement en contact avec la membrane, mais pas très bien inséré (figure IV.23.a). Le système arrive donc probablement à un état d'équilibre sans se perméabiliser. En revanche, quand l'AMP est en conformation *trans*, ce qui veut dire qu'il y a une partie hydrophobe plus importante, le taux d'insertion est supérieur, la membrane est plus perturbée et des structures de perméation se créent - probablement transitoires et pas forcément descriptives en terme de pore (figure IV.23.b). Un état d'équilibre est alors de nouveau recherché, ce qui se traduit par des « hésitations » et des fluctuations du signal de très courte durée.

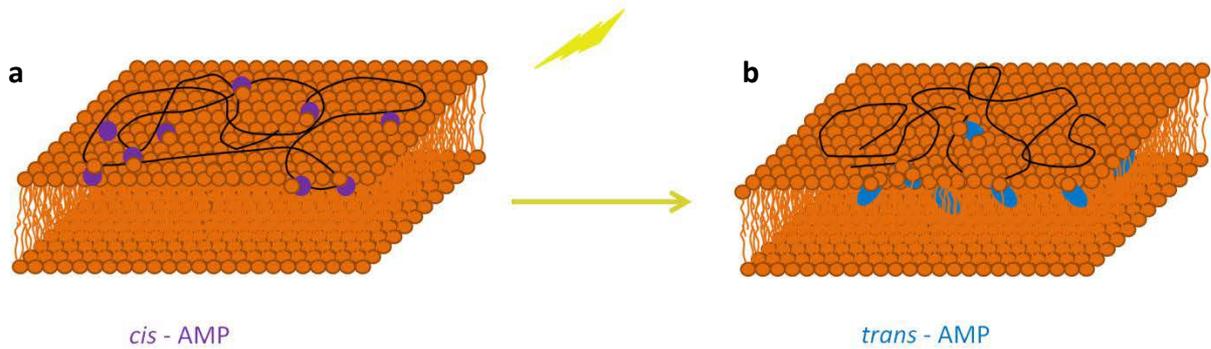


Figure IV.23 : Schéma d'un modèle décrivant l'insertion de l'AMP dans ses deux conformations (*cis* et *trans*). L'AMP interagit avec la membrane dès qu'ils sont en contact. En conformation *cis* (a), le taux d'insertion n'est pas suffisant pour déstabiliser la membrane en entraînant sa perméabilisation, contrairement à la conformation *trans* (b).

Pendant cette recherche d'équilibre, la bicouche peut se refermer, éventuellement en continuant des petites fluctuations de courte durée (de l'ordre de ms) ou bien la structure de perméation peut se stabiliser et/ou s'agrandir. Cette recherche d'équilibre correspond à une compétition entre la tension de surface de la bicouche et la tension de ligne au bord de cette structure. Des phénomènes de nucléation de l'AMP pourraient à cette étape jouer un rôle crucial (figure IV.24). De toute façon, cela doit être le cas dans le cas d'ouverture relativement stable : des phénomènes de nucléation semblent avoir lieu, ce qui expliquerait l'effet de l'augmentation graduelle de la concentration en AMP sur une membrane unique (vu figure IV.10).

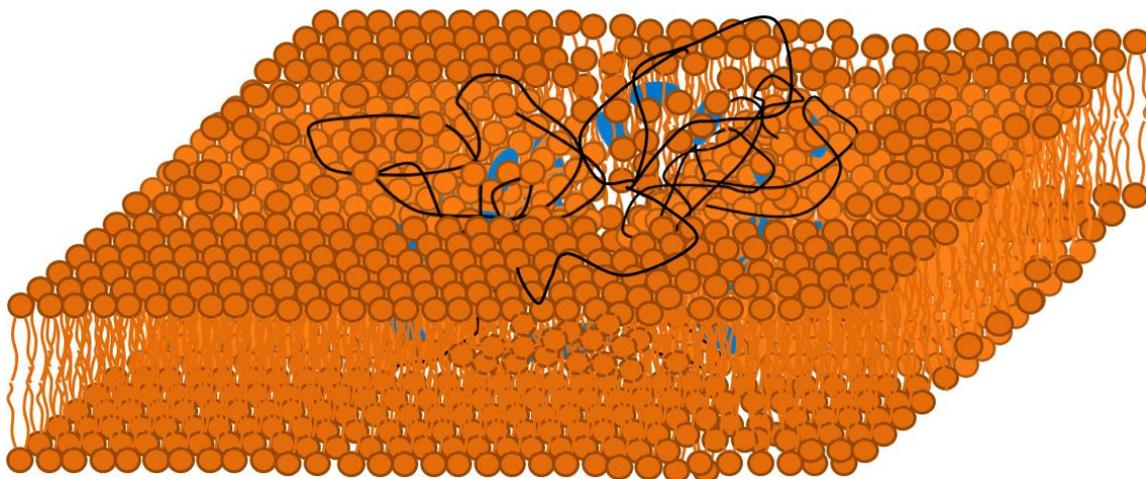


Figure IV.24 : Une présentation schématique de comment pourrait être un pore provoqué par l'interaction du *trans*-AMP avec la membrane. La taille de la structure, intermédiaire comme finale, peut varier.

À l'état final de perméabilisation stable, les structures de perméation sont symétriques pour les deux monocouches. Leur taille varie et dépasse très rarement les 2 nm (dans les conditions expérimentales utilisées), ce qui peut être lié par exemple au nombre de monomères « participant » à la création de la structure... Une quantification des tailles des pores, c'est-à-dire la détection d'une taille « minimale » d'ouverture, pourrait éventuellement nous donner accès au nombre minimale de partenaires nécessaires pour arriver à perméabiliser la bicouche. Mais une telle estimation n'a pu être faite.

Concernant la taille des pores créés, la possibilité de plusieurs pores formés dans la même bicouche est peu envisageable. En effet, si un pore est créé et même si la bicouche est perturbé par le *trans* – AMP dans un autre endroit, la tension devrait être relaxée de manière que pas d'autres structures de perméation se créent.

Dans ce modèle, l'AMP "tapisse" en quelque sorte la structure de perméation, sans adopter une structure particulière ; il peut donc présenter des boucles libres et fluctuantes. Ces dernières, très mobiles pourraient expliquer les fluctuations du signal après l'ouverture des pores entre un état stable et un état instable, ainsi que la fermeture de certains pores. En effet, l'accumulation d'AMP autour du bord du pore pourrait éventuellement « boucher » le pore ou déplacer l'équilibre en diminuant la tension de ligne au bord du pore. De plus, même si la fermeture spontanée des structures bien définies reste un point assez sombre, cette hypothèse est compatible avec le fait que les bicouches laissant passer des courants élevés se referment plus rarement que celles pour lesquelles des signaux plus faibles sont détectés.

Un tel mécanisme permet aussi d'expliquer pourquoi aucun changement de comportement n'est observé quand on illumine en UV une bicouche préalablement perméabilisée par la présence d'AMP en conformation *trans*. En effet, même si illuminé en UV, le basculement n'a plus d'effet détectable sur les pores bien définis. Le degré d'hydrophobicité de l'AMP peut ne pas être suffisant pour perméabiliser la membrane, mais en revanche peut être suffisant pour maintenir une ouverture établie.

Pour conclure

Les expériences d'électrophysiologie en BLM montrent que les structures de perméation observées en présence de trans – AMP sont des pores de taille variable, mais de diamètre inférieur à 2 nm pour les concentrations utilisées dans ce travail (la concentration la plus élevée étant de 5 µg/ml (trans – AMP/KCl 1 M). Le diamètre des pores ne semble pas être relié à l'épaisseur de la membrane (qui reste toujours dans une gamme qui mime bien l'épaisseur de la membrane cellulaire), ni à la concentration de l'AMP dans le compartiment. Cependant, il faut garder en tête l'idée que la concentration dans le compartiment n'est pas toujours la concentration réelle au voisinage de la membrane.

Un modèle sur le mécanisme de perméabilisation est proposé, expliquant le processus d'ouverture des pores, les différents types de fluctuations du signal entre deux états (avec toujours une différence de stabilité entre les deux états), ainsi que la non – fermeture du pore lors du passage de trans en cis.

V. Etudes dans des cellules

Après avoir vérifié l'effet perméabilisant du *trans* – AMP (et non perméabilisant du *cis* – AMP) sur des membranes modèles, des expériences ont aussi été faites avec des cellules afin d'étudier l'effet du polymère sur la paroi cellulaire et d'étudier la possibilité d'utiliser l'AMP comme molécule – livreuse d'autres molécules dans la cellule. Les expériences réalisées avec des cellules seront décrites et discutées dans ce chapitre.

Toutes les expériences ont été faites avec des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) sauvage (*wild type*) K1. Quand l'expérience le nécessite, les cellules (qui sont *a priori* adhérentes) sont mises en suspension. Dans un premier temps, la non cytotoxicité du 15C8 10azo pour les concentrations et les temps d'incubation utilisés a été vérifiée à l'aide du kit « Cell Counting Kit-8 » (*Dojind Molecular Technologies*). Les détails sur la culture cellulaire et le test de cytotoxicité sont données dans la partie D (matériel et méthodes).

V.1. Suivi de la fuite du contenu intra cellulaire

Afin de voir si la perméabilisation induite par le *trans* – AMP dans des membranes modèles, était retrouvée dans les cellules, son effet a été étudié sur des cellules CHO. Le relargage d'une molécule fluorescente préalablement introduite dans les cellules est suivi de manière quantitative (lecteur de fluorescence) au cours du temps *via* le suivi de la fluorescence du milieu extracellulaire après l'ajout de l'AMP.

V.1.a. La CFDA

La carboxyfluorescéine diacétate (CFDA - $C_{25}H_{16}O_9$) est un marqueur cellulaire extrinsèque : un préfluorochrome avec une masse moléculaire de 460,4 g/mol qui pénètre dans les cellules où il est hydrolysé par les estérases intracellulaires (figure V.1). La carboxyfluorescéine (CF), qui résulte de cette hydrolyse, est fluorescente et chargée (négativement) (Breeuwer, Drocourt *et al.* 1995). Elle est largement utilisée comme

sonde de viabilité pour les cellules, puisqu'une fois hydrolysée elle ne peut plus sortir de la cellule, indiquant ainsi que les cellules sont toujours vivantes : dans le cas de la mort de la cellule, la sonde serait relarguée à l'extérieur. Il faut noter que le pH joue aussi un rôle important : à pH basique, la CFDA est aussi hydrolysée en CF sans avoir été en contact avec le milieu intracellulaire, ce qu'il faut avoir en tête en travaillant avec cette molécule (Hoefel, Grooby *et al.* 2003; Sonesson, Callisen *et al.* 2008).

Étant donné les propriétés décrites ci – dessus, la CFDA pourrait donc être utilisée afin d'étudier la perméabilisation (ou la non perméabilisation) de la cellule : puisqu'elle ne peut pas sortir à travers de la membrane, elle est accumulée dans les cellules - si elles sont toujours vivantes - et donc, la présence de CF en dehors des cellules indiquerait que la cellule est perméable. De plus, la quantité de la fluorescence détectée pourrait être utilisée pour étudier la cinétique de la sortie et accéder au temps de création des structures de perméation.

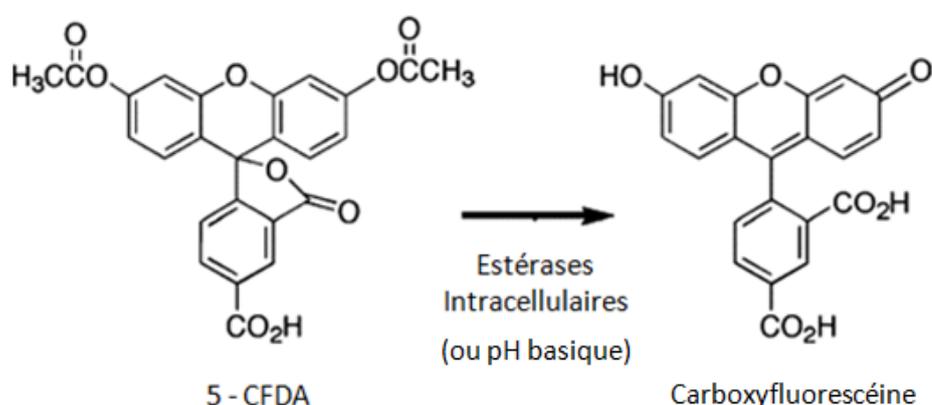


Figure V.1 : La CFDA, une fois entrée dans les cellules, est hydrolysée en CF.

V.1.b. Préparation de l'échantillon

Pour cette expérience des cellules en suspension ont été utilisées. Les cellules sont incubées avec de la CFDA (*Sigma Aldrich*) à 500 μ M concentration finale à 37°C pendant ~20 min. Par la suite la CFDA non entrée dans les cellules est éliminée et les cellules sont résuspendues dans du PBS. Deux tubes sont préparés (dont un sera utilisé comme témoin) et du 15C8 10azo ($50 \cdot 10^{-12}$ g AMP/cellule) en conformation *trans* est ajouté dans un de deux tubes. Les détails de la préparation sont donnés dans la partie D (matériel et méthodes).

Des aliquotes de 100 μl sont prélevées dans chaque tube toutes les 5 minutes pendant une heure et placées dans des tubes type "ependorf". Les tubes sont alors immédiatement (pour éviter la fuite supplémentaire des cellules) centrifugés et 70 μl de surnageant sont placés dans les puits d'une boîte (*NUNC 96 puits*) qui peut être lue en fluorescence par un lecteur de plaques (*Fluostar Optima, BMG LabTech*). Les 30 μl restants qui contiennent le culot sont repris dans 70 μl de PBS et sont aussi placés dans des puits de la plaque (figure V.2). Par la suite, la boîte est placée dans le lecteur de plaques et la fluorescence de chaque puits est lue (le filtre d'excitation étant à 485 nm et filtre d'émission à 520 nm).

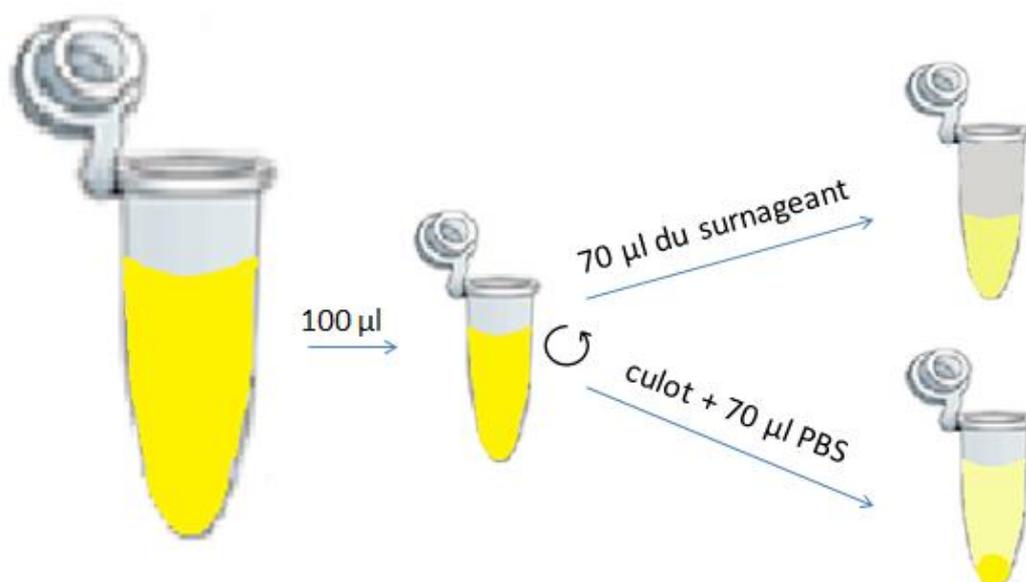


Figure V.2 : Chacun des deux tubes contenant les 100 μl est centrifugé et 70 μl du surnageant sont placés dans un puits. Ensuite, 70 μl de PBS est ajouté au culot et le tout est placé dans un autre puits de la boîte.

V.1.c. Résultats obtenus

La fluorescence du culot, aussi mesurée pendant l'expérience, rend possible la quantification et la normalisation des résultats obtenus (fluorescence du surnageant sur la fluorescence totale de l'aliquote – culot et surnageant), de manière à ce qu'ils soient comparables. Elle peut offrir en même temps un contrôle supplémentaire de la manipulation (la somme de la fluorescence du culot et de la fluorescence du surnageant devrait rester constante au cours du temps).

Les résultats obtenus (montrés figure V.3) montrent une augmentation de la fluorescence du surnageant prélevé des aliquotes provenant du tube dans lequel le *trans*-AMP a été ajouté, tandis que la fluorescence augmente beaucoup moins au cours du temps et avec un profil très différent dans le surnageant des aliquotes du tube témoin (en l'absence d'AMP). Cette petite augmentation peut être due à d'autres raisons, comme par exemple l'apoptose des cellules au cours du temps (rappelons que les cellules ne se trouvent pas dans un milieu nutritif) ou à la lumière « vue » par la CF du tube pendant le prélèvement des aliquotes. La fluorescence totale (culot + surnageant) de chaque aliquote est constante au cours du temps, ce qui indique qu'il n'y a pas de perte de fluorescence artificielle au cours de l'expérience.

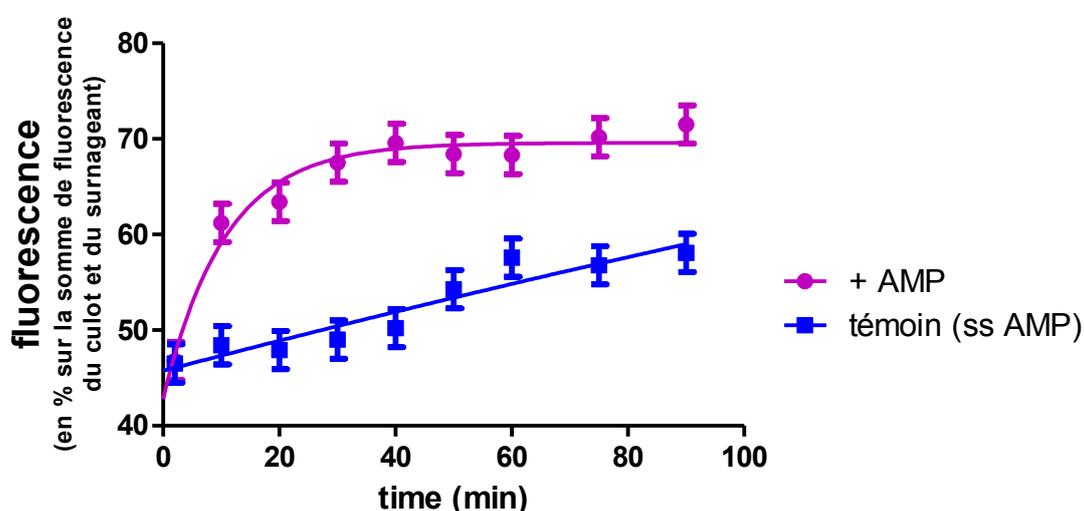


Figure V.3 : Fuite de la CF dans des CHO. L'évolution au cours du temps de la fluorescence du surnageant des CHO préalablement chargées en CFDA en présence de *trans*-AMP (violet) et en absence d'AMP (contrôle, bleu).

Comme déjà mentionné, les lectures de l'appareil sont utilisées afin de définir les pourcentages de CF qui a fuit des cellules. Ce qui peut être observé pourtant est que, dès le début, le pourcentage de fluorescence détectée en dehors des cellules est très élevé, ce qui n'était pas attendu, en tenant en compte les expériences précédemment réalisées avec l'AMP. Cette fuite aurait pu avoir été provoquée par la centrifugation des cellules ou être due à la mort des cellules dans le tube de l'aliquote – dont le milieu intérieur fuirait alors et dont la fluorescence serait détectée dans le surnageant. Les hypothèses avancées pour expliquer la fluorescence du surnageant dès le début de l'expérience ne sont guère satisfaisante pour justifier ce haut niveau, cependant la différence entre les conditions (en présence d'AMP et contrôle) reste significative.

En ce qui concerne la cinétique de fuite en présence d'AMP, il peut être observé que environ 25 minutes après l'ajout du *trans* – AMP, la fluorescence atteint un plateau, indiquant qu'un équilibre est atteint ; le plateau est à peu près à 70%. La fluorescence du surnageant du tube témoin, sans ajout d'AMP, augmente de manière linéaire et est inférieure à 50% au moment où le plateau est atteint pour le tube où l'AMP a été ajouté.

Le plateau à 70% est le plateau réel attendu, puisque la quantité du surnageant prélevé est à chaque fois 70 µl d'un total de 100 µl. Il s'agit donc du maximum de fluorescence qui pourrait être détectée. Un autre contrôle des mesures a été fait en provoquant la lyse des cellules (marquées en même temps que les cellules utilisées pour quantifier la fluorescence) à l'aide d'un détergent (Triton X-100). La valeur de fluorescence obtenue après la lyse des cellules est la même que la valeur de la fluorescence totale déjà évoquée.

V.2. Insertion des molécules dans les cellules à l'aide du 15C8 10azo

Le *trans* – AMP dont on a montré qu'il était capable de perméabiliser la bicouche lipidique en système modèle (GUV et BLM), semble capable de perméabiliser la membrane des cellules (au moins des cellules CHO K1). Afin de tester la possibilité d'utiliser le 15C8 10azo pour faire entrer des molécules d'intérêt dans les cellules de manière contrôlée, un peptide synthétisé et préalablement étudié au sein du laboratoire a été utilisé. Les expériences décrites ci-dessous ont été réalisées essentiellement par Dr. Astrid Walrant et Dr. Sarra Sebai.

V.2.a. Entrée du petit peptide R6L3

Le peptide R6L3 (RLLRRLRR) est un peptide court, riche en arginine (donc très fortement chargé positivement, +6), dont la structure a été conçue au laboratoire dans

le but d'étudier la relation entre la structure et l'activité des peptides – vecteurs. Il peut se structurer en hélice – α amphiphile. Il fait partie de la famille de peptides dérivés de la structure de la pénétratine, largement étudiés au laboratoire.

En particulier, il a été montré que ce peptide R6L3 ne s'internalise pas dans les cellules (Walrant, Correia *et al.* 2011) bien qu'il se lie en quantité importante à la membrane. Le protocole utilisé (décrit ci – dessous et détaillé dans la partie D) s'appuie sur le protocole de quantification par spectrométrie de masse qui a été mis au point au sein du laboratoire (Burlina, Sagan *et al.* 2006) et permet la distinction entre la quantité de peptide « collé » sur la membrane et celle de peptide internalisé dans les cellules.

Ces propriétés du R6L3 étant établies, il peut être utilisé afin d'étudier, pour la première fois, la possibilité d'utilisation du 15C8 10azo pour délivrer d'autres molécules dans des cellules : le peptide R6L3 lui – même n'a pas la capacité de rentrer dans les cellules.

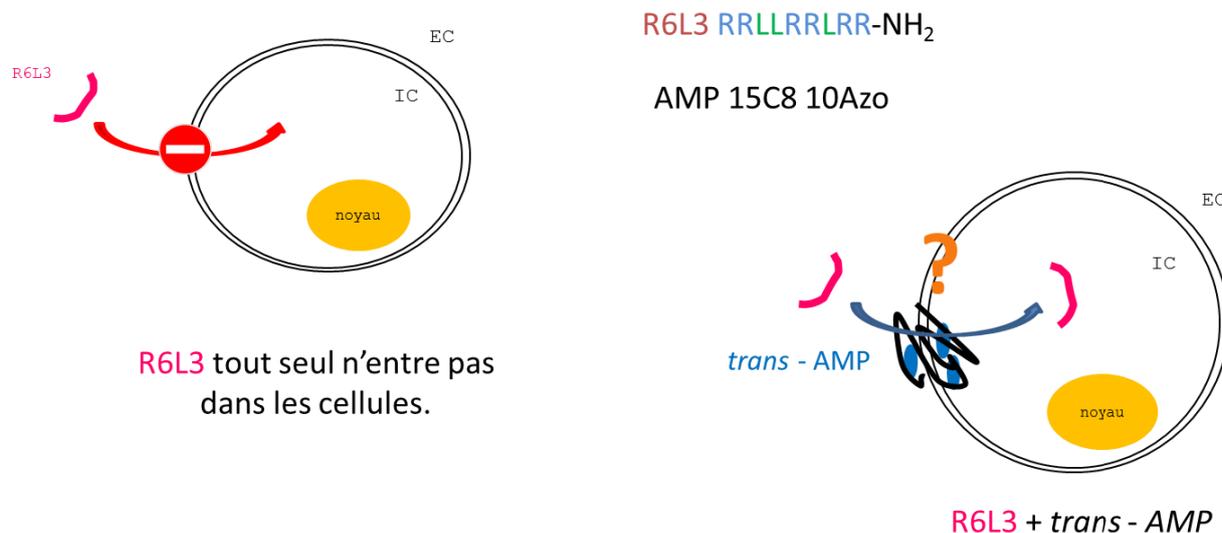


Figure V.4 : Schéma de principe de l'expérience d'internalisation du RL9 en présence d'AMP : Le RL9 est un peptide qui n'est pas internalisé dans les cellules. Après incubation des cellules en présence de RL9 et de *trans* – AMP, du R6L3 sera-t-il détecté dans le milieu intracellulaire ?

Pour ce faire, le 15C8 10azo dans chacune de ses conformations a été incubé avec des cellules CHO. Quand l'AMP est incubé dans sa conformation *cis*, le R6L3 ne devrait pas être détecté à l'intérieur des cellules, contrairement au cas de l'incubation dans la conformation *trans*. Deux types d'expérience ont été réalisés ; le premier consistait à incuber dans un premier temps les cellules avec l'AMP (*cis* ou *trans*) et ensuite le tout

avec le R6L3. Un deuxième type d'expérience consistait à incuber l'ensemble après ajout simultané de l'AMP et du R6L3 aux mêmes concentrations.

- **Préparation de l'échantillon (Walrant 2011)**

Dans le premier type d'expérience, l'AMP (*cis* ou *trans*) est solubilisé et ajouté dans chaque puits contenant des cellules CHO adhérentes (à 0,15 ou à 1,19 μM) pendant 30 minutes (37°C). Ensuite, le tout est incubé avec le R6L3 (à 0,1 μM) pendant une heure. Dans le deuxième type d'expérience l'AMP et le R6L3 sont ajoutés dans les puits des cellules en même temps aux mêmes concentrations et toujours à 37°C, pendant une heure. Tout est réalisé sous une lampe rouge, afin de limiter le changement de conformation de l'AMP.

Après l'incubation, les cellules sont lavées plusieurs fois pour éliminer le peptide en solution ou faiblement lié aux cellules. Le peptide associé à la membrane est digéré et les cellules sont détachées du fond des puits à l'aide de trypsine. La quantification du peptide inséré dans les cellules repose sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Un étalon interne qui va nous permettre la quantification de R6L3 internalisé est alors ajouté et par la suite les cellules sont lysées. Les lysats sont centrifugés et les surnageants contenant les peptides (à quantifier et étalon) récupérés. Les peptides sont capturés à l'aide des billes magnétiques et ensuite étudiés par spectrométrie de masse.

Les détails de ce protocole sont donnés dans la partie D.

- **Résultats obtenus**

Les résultats obtenus sont résumés dans le graphe de la figure V.5. La quantité de R6L3 internalisé en l'absence d'AMP est extrêmement faible, alors qu'en présence d'AMP cette quantité augmente et cela est le cas pour les deux conformations : *cis* et *trans*. Cependant, en conformation *trans* la quantité de peptide internalisée est plus importante, surtout dans le cas de l'incubation de l'AMP et du R6L3 simultanément (en

moyenne 1,5 pmol de R6L3 internalisé en présence du *cis* – AMP contre 4,5 pmol pour le *trans* – AMP).

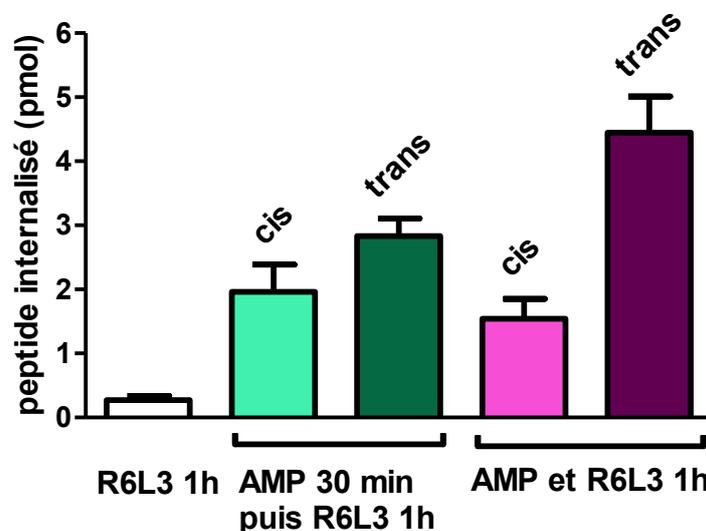


Figure V.5 : Les quantités de R6L3 internalisés pour les différentes conditions testées. En blanc la quantité de peptide détecté en l'absence AMP.

Ces résultats montrent que la présence d'AMP permet de faire entrer ce peptide dans les cellules. La différence entre les deux conditions testées peut fournir des informations sur le mécanisme exact de cette insertion. En effet, la quantité de R6L3 internalisé est supérieure quand le *trans* – AMP et le R6L3 sont simultanément incubés avec les cellules, alors que quand l'AMP est préalablement incubé avec les cellules avant l'ajout de R6L3, la quantité de R6L3 internalisé est moins importante. De plus, la différence de comportement entre les deux conformations de l'AMP, est beaucoup plus nette dans le cas d'une incubation simultanée. Tout cela pourrait nous conduire à conclure qu'il y a peut être un autre mécanisme dominant à chaque condition.

En effet, dans le cas de l'incubation en deux temps, des pores pourraient être créés alors que les cellules ne sont pas encore en contact avec le peptide. Il est donc probable que les pores (ou une partie des pores) se sont refermés avant l'ajout de R6L3. Étant donné que les cellules ont des mécanismes pour la protection de leur intégrité, la durée de vie des pores pourrait être moins importante que la durée des pores étudiés en systèmes modèles. Quand les pores se referment, le *trans* - AMP reste probablement intégré dans la membrane plasmique et le *cis* – AMP est a priori en contact avec elle, ce qui au

moment de l'ajout du R6L3 pourrait jouer un rôle pour l'internalisation du peptide et expliquer le faible écart de la quantité de R6L3 internalisé entre les deux conformations de l'AMP. En revanche, dans le cas d'incubation simultanée, le peptide est internalisé en présence du R6L3. Dans ce cas, une différence importante entre les quantités du peptide internalisée pour les deux conformations a été montrée.

La détection d'une quantité de peptide internalisé peut être expliquée par la combinaison des propriétés de deux molécules incubées avec les cellules. Selon le modèle proposé à la fin du chapitre IV, le *cis* – AMP perturbe la membrane sans la perméabiliser ; le R6L3 a été montré d'avoir le même effet (Walrant, Correia *et al.* 2011). Il n'est, donc, pas plausible de supposer qu'une combinaison de deux molécules pourrait perméabiliser la membrane plasmique.

Pourtant, il reste beaucoup de questions ouvertes et tout d'abord l'interaction éventuelle entre l'AMP et le peptide R6L3. Si les deux molécules interagissent, il devient plus difficile de comparer les résultats de deux types d'expérience décrits, étant donné que le partenaire des cellules ne sera plus le même. Cependant, malgré toutes ces questions qui restent pour le moment ouvertes, le résultat important est que nous montrons ici que le R6L3, un peptide qui *a priori* ne pénètre pas la membrane, peut être internalisé dans les cellules en présence d'AMP.

Une partie de ces résultats (incubation simultanée des cellules avec le R6L3 et l'AMP en conformation *trans* ou *cis*) a été publié dans *Angewandte Chemie* (Sebai, Milioni *et al.* 2012).

V.2.b. Étude de l'interaction 15C8 10azo – R6L3

Dans le but d'examiner la possibilité d'étendre l'utilisation de l'AMP pour l'insertion de différentes molécules dans les cellules, il faudra aller plus loin et voir s'il y a une sélectivité sur le processus suivi ou si cette utilisation pourrait être généralisée.

Les résultats présentés au paragraphe précédent, font apparaître une influence de la chronologie de l'incubation : selon que les cellules ont été incubées avec le R6L3 et l'AMP simultanément ou non, les résultats sont différents. Une explication pourrait être le rôle des charges (le peptide R6L3 étant chargé positivement et le 15C8 10azo chargé négativement), résultant par exemple en une interaction des deux molécules en solution avant leur contact avec la membrane. L'idée est de voir si c'est un complexe de deux molécules qui pénètre dans les cellules, ou si c'est le R6L3 isolé qui entre dans les cellules à travers les structures de perméation formées par le polymère seul ; dans cette seconde hypothèse, la généralisation des résultats concernant la capacité de l'AMP à faire rentrer des molécules dans la cellule serait envisageable.

Afin d'étudier l'interaction entre AMP et R6L3 nous avons utilisé la méthode de calorimétrie de titrage isotherme.

- **La calorimétrie de titrage isotherme** (Isothermal Titration Calorimetry – ITC)

La calorimétrie de titrage isotherme (ITC pour *Isothermal Titration Calorimetry*) permet de mesurer l'affinité entre deux molécules. La mesure est celle de la chaleur dégagée (ou absorbée) lors de l'interaction entre deux partenaires. Le dispositif est constitué de deux cellules identiques, une cellule de référence et une cellule de mesure, placées dans une enceinte adiabatique. Une des molécules est placée dans la cellule de mesure et l'autre est injectée graduellement en petits volumes dans la cellule de mesure à intervalles de temps réguliers (figure V.6).

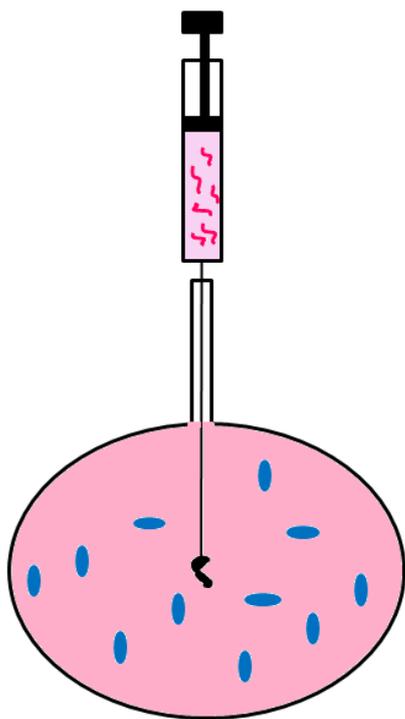


Figure V.6 : Le principe de l'ITC. Une des molécules (représentée en bleue ici) est placée dans la cellule de mesure et l'autre (en rose) est injectée graduellement en petits volumes. La cellule de référence, identique à la cellule de mesure, n'est pas montrée ici.

À chaque injection, les deux partenaires interagissent et la chaleur résultante induit transitoirement une variation de température dans la cellule de mesure. L'appareil est conçu pour maintenir la température de la cellule de mesure égale à la température de la cellule de référence (d'où l'appellation « isotherme ») qui, elle, elle reste constante. Une certaine puissance (grandeur algébrique) est donc fournie pour ramener la cellule de mesure à la température de référence. C'est cette puissance qui est mesurée au cours de l'expérience et tracée en fonction du temps, le temps de chaque injection correspondant à une augmentation de la concentration du partenaire injecté dans la cellule (comme montré figure V.7.a). L'intégration de l'aire sous chaque pic donne la chaleur dégagée suite à chaque injection. Les paramètres de l'interaction, telles que l'enthalpie molaire, la stœchiométrie et la constante de réaction peuvent ainsi être calculés (figure V.7.b).

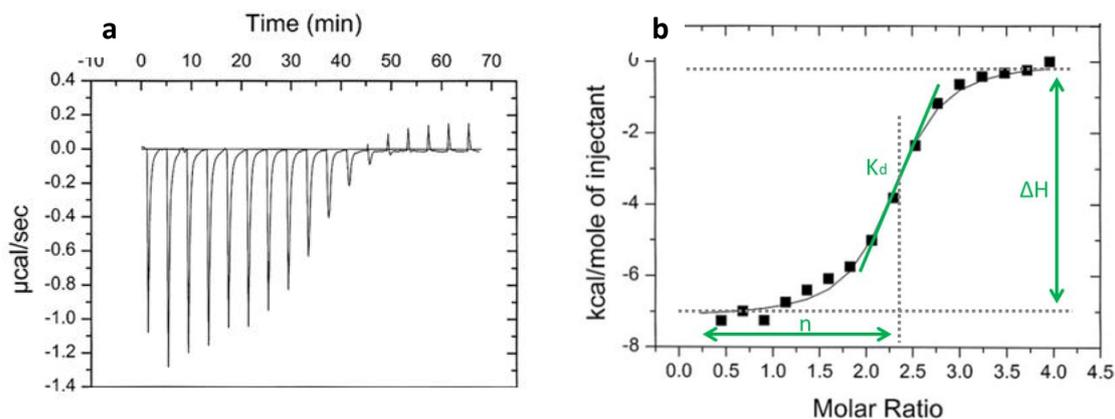


Figure V.7 : Calorimétrie ITC **a.** puissance fournie par le dispositif à la cellule de mesure en fonction du temps, il s'agit ici d'une réaction endothermique, **b.** isotherme déterminée par intégration des données de **a.** permettant l'accès aux paramètres caractéristiques de l'interaction : la constante d'association K_d , la stœchiométrie et l'enthalpie molaire. Les graphes utilisés sont tirés de (Dam, Torres *et al.* 2008).

Plus précisément, la pente de la sigmoïde (isotherme expérimentale, définie à partir des points expérimentaux) au point d'inflexion correspond à la constante de dissociation de l'interaction entre les deux partenaires. L'isotherme est caractérisée par un paramètre c , telle que $C=K_a \cdot [M] \cdot n$, où K_a la constante d'association de l'interaction, $[M]$ la concentration de la macromolécule se trouvant dans la cellule et n le paramètre caractérisant la stœchiométrie ($n : 1$ de l'association entre le ligand et la macromolécule). Pour que la courbe expérimentale puisse être interprétée, il est nécessaire que la valeur de c soit comprise entre 1 et 1000. Pour de faibles valeurs de c , la forme caractéristique sigmoïdale du graphe est perdue : la transition devient très large, s'approchant d'une relation linéaire (Diab, Tribet *et al.* 2007).

L'ITC nous donne accès aux caractéristiques des interactions non - spécifiques, comme les interactions hydrophobes ou électrostatiques (Ball and Maechling 2009).

- Interaction *trans* – AMP et R6L3

L'expérience a été réalisée avec un appareil *NanoITC* (TA Instruments) et les résultats ont été lus et traités à l'aide du logiciel associé (*NanoAnalyze*). Les détails sont donnés dans la partie D (matériel et méthodes).

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une interaction entre le *trans* – AMP et le R6L3. Les résultats d'une des expériences sont montrés figure V.8. Il s'agit d'une réaction exothermique, la chaleur libérée étant de 27,7 ($\pm 0,6$) kJ/mol. La stœchiométrie est de 1,8 mol de R6L3 pour une mole d'AMP et l'affinité de la liaison (K_d) est de $2,3 \cdot 10^{-6}$. Les valeurs données sont les valeurs moyennes des trois expériences réalisées dans les mêmes conditions, seul l'ajustement "mono-site" donne des résultats reproductibles, il est donc choisi comme le mieux adapté.

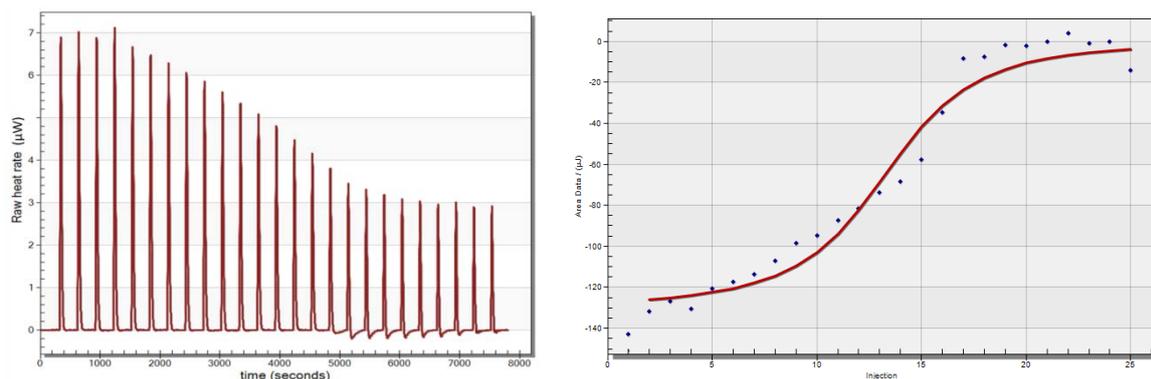


Figure V.8 : **a.** Chaleur dégagée au cours du temps lors du titrage de *trans* - AMP par le R6L3. Chaque pic correspond à une injection de R6L3 dans la cellule contenant le *trans* - AMP. Les injections ont lieu toutes les 5 minutes, **b.** Chaleur dégagée à chaque injection en fonction du nombre d'injection (donnant accès au ratio molaire (R6L3/AMP)). Ainsi, on a accès à l'enthalpie molaire de la réaction (amplitude de la courbe), à la stœchiométrie (position du point d'inflexion) et à la constante d'affinité (pente à l'inflexion).

Cette interaction entre le peptide R6L3 et l'AMP, permet d'imaginer que l'internalisation du R6L3, mise en évidence dans l'expérience décrite au paragraphe précédent, peut être –au moins en partie - liée à la formation d'un complexe entre les deux molécules (préalablement à l'interaction avec la membrane dans le cas d'incubation simultanée). Ce qui serait intéressant serait l'étude de l'interaction du *cis* – AMP avec le R6L3, avant de chercher une interprétation concrète. Cela n'a pas été réalisé pour le moment pour des raisons techniques (la conception de l'appareil ne permet pas de travailler dans le noir, ni sous UV).

- Interaction *trans* – AMP et [Met9]-SP

Dans le but de pousser plus avant cette hypothèse et d'étudier le rôle de l'interaction entre l'AMP et le R6L3, l'interaction du *trans* – AMP avec le peptide [Met9]-SP a été

étudiée. Il s'agit d'un neuropeptide, beaucoup moins chargé, dont la séquence est RPKPQEFFMLM (charge +1 contre +6 pour le R6L3).

Des expériences similaires à celles décrites dans le paragraphe précédent ont été menées, dans les mêmes conditions expérimentales. Ces études en ITC indiquent que le peptide [Met9]-SP et le *trans* – AMP n'interagissent pas de façon significative. En effet, les pics correspondant aux différentes injections de peptide [Met9]-SP dans la cellule contenant l'AMP sont du même ordre de grandeur que les pics obtenus pour l'expérience de contrôle (injection du [Met9]-SP dans la cellule remplie de DMEM, mais ne contenant pas d'AMP). Ces résultats ne sont pas présentés. Différentes concentrations ont été testées dans le but d'éliminer la possibilité de ne pas avoir la résolution nécessaire pour que l'interaction soit détectée.

Ces résultats mettent en évidence la différence d'interaction du *trans* - AMP avec différentes molécules, ce qui ne nous permet pas pour le moment de tenter de généraliser la possibilité d'utiliser l'AMP pour faire rentrer différentes molécules dans des cellules. Malgré le fait que la différence de charge était le paramètre fondamental pour lequel le peptide [Met9]-SP a été choisi pour cette dernière expérience, il faudrait mettre en place plus d'expériences afin de conclure sur les paramètres cruciaux (ou la combinaison de paramètres cruciaux), comme pourrait être aussi l'hydrophobie, qui définissent finalement l'interaction (ou non) d'une molécule avec l'AMP.

Cependant, cette observation nous offre un outil pour mieux comprendre le mécanisme de l'interaction entre l'AMP et la membrane et la création (ou la non création) des structures de perméation. Il faudrait maintenant étudier la possibilité d'une internalisation d'un peptide comme le [Met9]-SP dans les cellules, et la comparer à celle du R6L3. Les quantités seraient-elles comparables ? Si une différence de comportement entre les deux est observée serait-ce seulement dû à la différence de charge ou s'agirait-il de plusieurs facteurs plus complexes à déterminer ?

Pour conclure :

L'AMP a été montré comme pouvant faire entrer un petit peptide chargé positivement (R6L3) dans des cellules CHO, peptide a priori incapable d'y pénétrer. Le mécanisme simple proposé à la fin du chapitre IV ne semble plus utilisable dans le contexte cellulaire ; cela n'est pas surprenant, étant donnée la complexité des cellules par rapport aux systèmes modèles.

Les résultats obtenus pour les différentes chronologies d'incubation des deux molécules avec les cellules (simultanée ou séquentielle), ainsi que les disparités mesurées dans chaque condition entre les configurations cis et trans de l'AMP, nous poussent à chercher plus loin. Dans un premier temps, l'interaction de l'AMP avec le peptide utilisé est étudiée par ITC. Les deux molécules sont montrées comme interagissant entre elles. Le même type d'expérience est réalisé avec un autre peptide, beaucoup moins chargé ([Met9]-SP). Dans ce cas, aucune interaction n'est détectée.

Plusieurs questions restent ouvertes. Dans un premier temps, il est nécessaire d'étudier l'interaction du cis – AMP avec le R6L3, et d'essayer de faire entrer dans les cellules le [Met9]-SP. Par la suite, les réponses et les interprétations des résultats peuvent nous faire avancer à l'étude du mécanisme au niveau cellulaire et par conséquent, à mieux contrôler le comportement de l'AMP dans ses deux conformations...

C. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VI. Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis la caractérisation des structures de perméation induites par l'AMP en conformation *trans*, en vérifiant l'importance de la différence du taux d'hydrophobicité entre les deux conformations de l'AMP 15C₈ 10azo. De plus, son effet a été étudié dans le contexte cellulaire.

La fuite des sondes fluorescentes encapsulées est attribuée à la présence de structures de perméation. Ces dernières ne sont pas observables en microscopie optique, elles doivent donc être de taille submicrométrique. Par ailleurs, la similarité des cinétiques des trois sondes de différente masse moléculaire et la nature des molécules utilisées (dextranes marqués en rhodamine B) nous amènent à la conclusion que la sortie des trois macromolécules se fait selon le même mécanisme. Soit les trois dextranes utilisés doivent se "déplier" pour passer à travers les structures de perméation, soit les trois molécules sortent en pelote, y compris la molécule de plus grand rayon hydrodynamique. En prenant en compte la diversité des rayons hydrodynamiques connus pour le dextrane et si, de manière arbitraire pour le moment, les structures de perméation créées sont considérées comme des pores, cette hypothèse est cohérente soit avec des structures de moins de 2 ou 3 nm, soit avec des structures de plus de 12 nm.

Afin d'étudier l'effet de l'AMP dans un système différent, mais aussi pour avoir accès à l'échelle nanométrique, des expériences d'électrophysiologie ont été réalisées en utilisant des BLM. L'existence d'une conformation perméabilisante (*trans* – AMP) et une conformation non perméabilisante (*cis* – AMP), indépendamment du système modèle utilisé, a été confirmée. De plus, il a été constaté que le contrôle de la perméabilisation d'une bicouche sur laquelle du *cis* – AMP est ajouté peut a priori avoir lieu en provoquant l'isomérisation en *trans*, même si en revanche, pour une membrane perméabilisée par ajout de *trans* – AMP, l'isomérisation en *cis* – AMP n'a pas d'effet détectable. Les structures de perméation peuvent être qualifiées de pores, elles sont de taille variée. Aucun paramètre crucial au niveau de la taille des pores n'a encore pu être mis en évidence. Cependant, dans les conditions de nos expériences, leur diamètre reste toujours inférieur à 2 nm.

Un modèle pour le mécanisme de création de ces pores est proposé : l'AMP se lie à la membrane ; étant donnée l'hydrophobicité du *trans* – AMP, plus élevée que celle du *cis* - AMP, son taux d'insertion est plus important et, contrairement à la conformation *cis*, suffisant pour déstabiliser la membrane. Ces déstabilisations locales peuvent conduire à la formation des pores si la tension de surface le permet. Des phénomènes de nucléation doivent avoir lieu, ce qui va permettre à une structure transitoire de se stabiliser en pore. La présence de boucles libres d'AMP pourrait être à l'origine des fluctuations détectées à différentes étapes de la formation des pores.

Il reste cependant des questions ouvertes. Il faudra voir par exemple si une partie de l'AMP est internalisée, pendant la perméabilisation ou après. Pour cela, dans les expériences sur BLM, la présence ou non d'AMP dans le compartiment cationique (dans lequel aucun AMP n'est ajouté initialement) pourrait être étudiée, *via* des expériences de diffusion de lumière.

Concernant le contexte cellulaire, la fuite des molécules fluorescentes encapsulées dans les cellules sur lesquelles l'AMP (*cis* ou *trans*) est ensuite ajouté a été suivie au cours du temps. Cela a permis de mettre en évidence l'effet perméabilisant du *trans* – AMP pour des cellules *via* la libération des molécules se trouvant dans le milieu intracellulaire. Par la suite, les données obtenues lors d'expériences d'administration d'une petite molécule dans des cellules ont montré que l'AMP peut effectivement faire entrer dans les cellules, un peptide qui *a priori* ne s'internalise pas. Cependant, la quantité internalisée, ainsi que la différence d'effet entre les deux conformations de l'AMP, dépendent de la chronologie de l'ajout des deux molécules (AMP et peptide). L'interaction entre ces deux molécules a été étudiée par ITC. Les résultats montrent qu'il existe une interaction, elle pourrait être liée à la charge du peptide.

Il est probable que le modèle établi à partir des données obtenues à l'aide des membranes modèles ne soit pas applicable à l'identique aux cellules, étant donné la complexité des cellules et en particulier leurs mécanismes de réparation. La probabilité de fermeture des pores de manière spontanée et (plus) rapide, et la mise en évidence d'un complexe entre le

trans – AMP et le peptide utilisé pour les expériences d'internalisation, montrent qu'il reste encore de paramètres à étudier pour étendre notre modèle aux systèmes cellulaires.

Pour conclure, nous avons confirmé et renforcé l'idée que l'AMP une molécule particulièrement intéressante, pour faire de la perméabilisation photocontrôlée d'une part et pour comprendre de manière plus générale le mécanisme de perméabilisation des membranes d'autre part. Pendant ces travaux de thèse et en utilisant d'un côté le contexte des membranes – modèles et d'autre côté le contexte cellulaire, les structures de perméation provoquées par son interaction avec la membrane ont été étudiées et de nouveaux éclairages sur le mécanisme de perméabilisation ont pu être proposés. Cependant, le rôle de certains paramètres, comme la concentration de l'AMP, reste à préciser. Il est vrai qu'en électrophysiologie des BLM aucun effet n'a pu être mis en évidence, mais il est possible que cela soit (partiellement ou non) dû à des artefacts expérimentaux. La durée de vie des pores reste aussi un paramètre à étudier, s'il peut être contrôlé ou s'il s'agit d'un processus complètement aléatoire (au moins dans le contexte des systèmes modèles).

Une vision plus claire de tous les paramètres jouant un rôle pourra nous permettre de maîtriser la perméabilisation *via* l'AMP, de manière à pouvoir l'utiliser comme un outil d'administration des molécules. De plus, cela nous permettra peut-être de développer d'autres molécules, améliorées et peut-être mieux contrôlables.

D. MATERIEL ET METHODES

1. Expériences sur des GUV

1.a. Fabrication des GUV et des *pol* - GUV

Les GUV sont préparées selon la méthode d'électroformation (Angelova and Dimitrov 1986; Mathivet, Cribier *et al.* 1996) principe de la méthode d'électroformation est d'hydrater un film lipidique sous un champ électrique oscillant. Elle permet la préparation des vésicules à partir d'une grande variété de lipides, sous réserve que l'ensemble ne contienne pas une charge nette trop importante.

Le dispositif utilisé est le dispositif commercial « *Vesicle Prep Pro* » de *Nanion Technologies* (figure 1.1). La DOPC (*AvantiPolar Lipids*, concentration initiale 10 mg/ml) est diluée à 0,25 mg/ml dans un mélange Chloroforme : Méthanol (4 : 1). Le C¹²₁₈ NBD (NitroBenzoxaDiazole) – PC (synthétisé au Laboratoire de Biologie Physico-Chimique des Protéines Membranaires UMR 7099) y est ajouté à 1% (w/w). Dans le cas des *pol* - GUV, 0,1 g d'AMP /g de lipides est aussi ajouté dans le mélange. L'osmolarité des tampons est mesurée à l'aide d'un osmomètre *Roebbling* et le pH à l'aide d'un pHmètre *Mettler Toledo MP220*.

Quelques µl de la solution organique lipidique (50 µl sur ~7 cm²) sont déposés sur les faces conductrices (recouvertes d'une couche de ITO - Indium Tin Oxide) des deux lames de verre, placées préalablement sur une plaque chauffante réglée à 40 – 45 °C afin d'accélérer l'évaporation du solvant organique et d'éviter l'écoulement du mélange en dehors de la région d'intérêt. Le dépôt doit être réalisé avec le plus soin possible pour en assurer l'homogénéité. En effet, la qualité du film est un facteur important pour la fabrication des GUV.

Le dépôt lipidique ainsi obtenu est placé dans une enceinte sous vide pendant 1h afin d'éliminer le solvant résiduel. Les deux plaques sont ensuite posées l'une face à l'autre séparées par un joint torique, de façon que le tout forme une chambre fermée et isolée. Le tout est maintenu solidaire grâce au squelette plastique et ses vis (figure 1.2). Nous remplissons alors cette chambre avec le tampon (qui constituera le milieu des vésicules) saccharose 300 mM, Tris 20 mM et dextrane fluorescent 4g/L, pH 8,5 (~100 mOsm). Les

dextranes fluorescents (RITC, pour Rhodamine B isothiocyanate et TRITC, pour Tetramethylrhodamine B isothiocyanate) utilisés sont de différents poids moléculaires (*Sigma Aldrich*) (10k, 70k et 155k). Après le remplissage de la chambre de fabrication, une tension électrique alternative - décrite plus bas - est appliquée. Toutes les solutions utilisées sont filtrées à 0,2 μm pour éviter la présence de bactéries.



Figure 1.2 : Les deux plaques recouvertes d'ITO sont mises face à face avec un joint en caoutchouc entre elles qui fait que l'ensemble forme une chambre (a). Le tout est maintenu grâce à un squelette en plastique (b), connecté à la base (contrôle des paramètres de gonflement) et placée sur celle-ci (c).

Deux protocoles ont été utilisés au cours de ces travaux de thèse pour la fabrication des pol – GU et des GU. Le premier est le protocole basique proposé par Nanion Technologies, dont les différentes étapes sont montrées figure 1.3: l'amplitude de la tension est de 3 V et sa fréquence de 5 Hz. Le temps de montée de la tension est de 20 minutes, l'étape principale de gonflement dure 3 heures et la tension revient à zéro en 20 min. La durée totale du protocole est de moins de 4 heures.

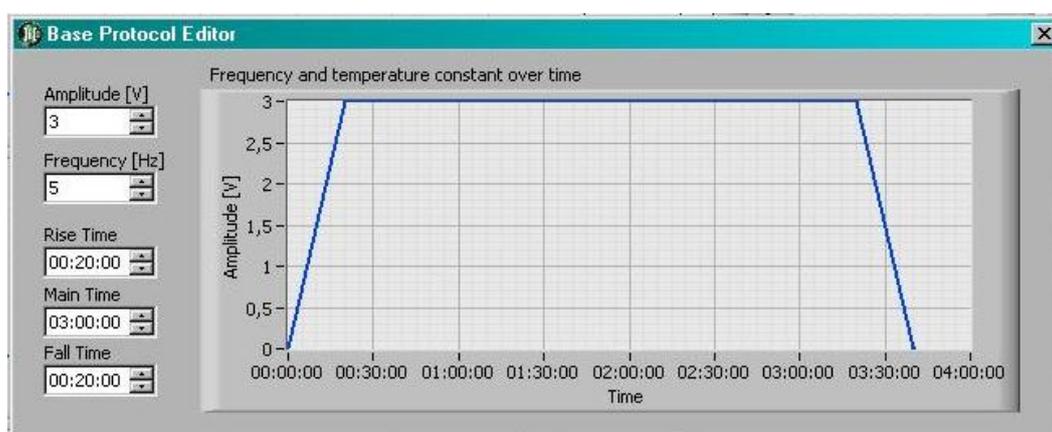


Figure 1.3 : Le « protocole de base » fourni avec l'appareil par Nanion Technologies.

Un second protocole a aussi été utilisé et est présenté figure 1.4 : dans ce protocole, l'amplitude principale est 1,1 V et la fréquence 10 Hz. La durée totale est de moins de 5 heures. Après le plateau de gonflement, l'amplitude est portée à 1,3 V et la fréquence diminuée à 4 Hz pendant 30 min. Cette étape a pour but de faciliter le détachement des vésicules du dépôt lipidique. Ce protocole s'inspire du protocole « historique » de l'équipe (Mathivet, Cribier *et al.* 1996).

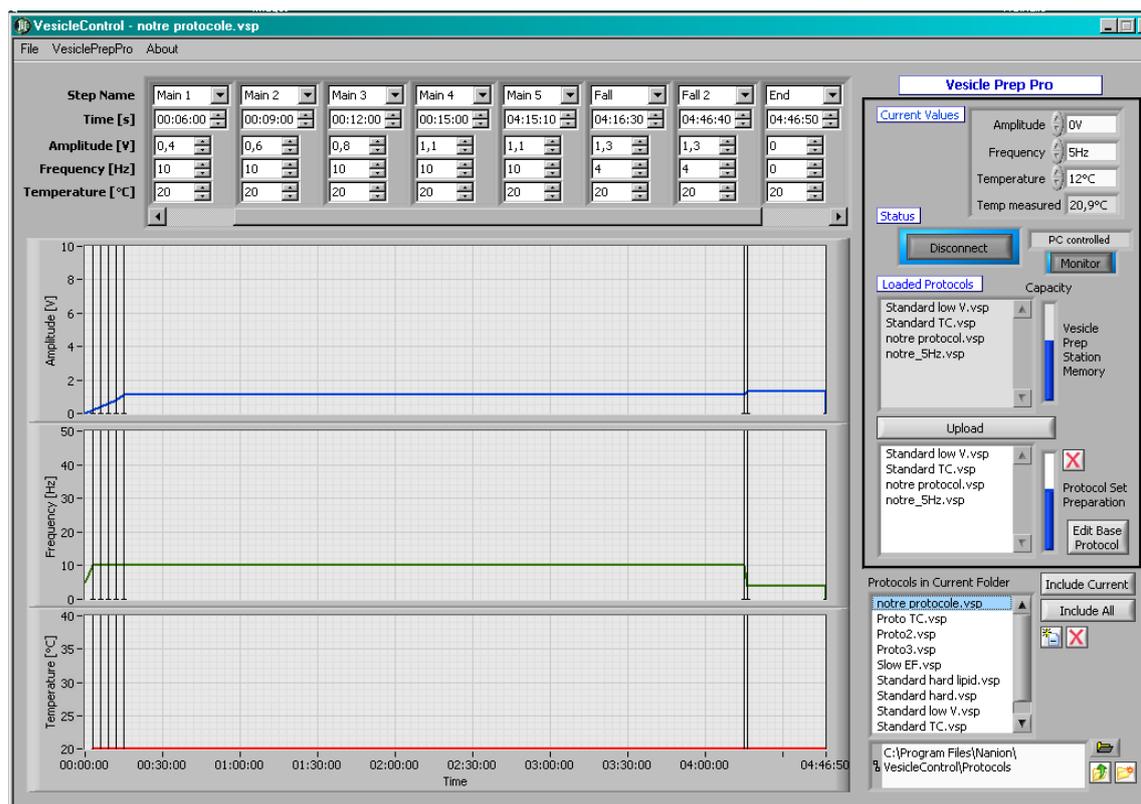


Figure 1.4 : Les différentes étapes du protocole modifié au laboratoire.

À la fin des différentes étapes, les GUV sont récupérées - à l'aide d'une pipette dont l'extrémité est coupée pour éviter les effets de cisaillement fort, mises dans un flacon en verre. Elles sont conservées à 4°C et à l'abri de la lumière et sont utilisées dans la semaine suivant leur fabrication, on estime qu'aucune dégradation lipidique détectable n'a lieu dans ce laps de temps.

Pour les deux protocoles de gonflement décrits ci-dessus aucune différence entre les GUV obtenues n'a été observée. Ceci est probablement dû à la composition simple des GUV

utilisée dans le cadre de ces travaux de thèse (un seul type de lipides a été utilisé pour leur formation). Le protocole utilisé pour chaque expérience ne sera donc pas précisé.

1.b. Observation des GUV sous microscope

La composition du tampon "extérieur" d'observation des GUV est Glucose 50 mM, Tris 20 mM et NaCl 15 mM, soit à pH 7 (trans-AMP) ou à pH 8,5 (cis-AMP), ~112 mOsm.

- **Traitement des boîtes de Petri à la BSA**

La BSA (Bovine serum albumin) est une protéine de 66,5 kDa extraite du sérum de bovin qui est utilisée ici parce qu'elle se fixe au plastique ou au verre via des interactions électrostatiques, limitant ainsi les interactions entre les lipides (ou le polymère) et le fond en verre de la boîte de Petri (*MatTek Corporation Ashland, MA*) utilisée pour l'observation sous microscope. Les boîtes sont remplies de BSA à 10% dans de l'eau distillée (w/w) qui est laissé 20 minutes. Elles sont alors vidées et rincées abondamment à l'eau puis séchées. Elles peuvent être conservées à 4°C, cela permet de s'assurer que la couche de BSA ne se dégrade pas.

2. Expériences sur des BLM

2.a. Le dispositif utilisé, la fabrication des films noirs et la visualisation des résultats

La cellule de mesure (Warner Instruments) possède deux compartiments d'une contenance d'environ 1,5 ml, séparés par une paroi percée d'un trou de diamètre de $150\ \mu\text{m}$. Une différence de potentiel est imposée entre les deux compartiments ($-100\ \text{mV}$ dans la plupart des expériences réalisées) par l'intermédiaire de deux électrodes Ag/AgCl, chacune immergée dans un des deux compartiments (figure 2.1.a). Les deux électrodes servent aussi à mesurer le courant circulant entre les deux compartiments. Le tout est placé dans une cage Faraday, pour protéger le dispositif des perturbations électromagnétiques extérieures. Les électrodes sont reliées à une tête de mesure qui contient un convertisseur courant-potentiel et un préamplificateur. Le signal amplifié est envoyé à une chaîne d'acquisition et comprenant un système amplificateur, un filtre passe bas, un convertisseur analogique-digital et un système d'enregistrement, de stockage et d'analyse sur ordinateur (figure 2.1.b).

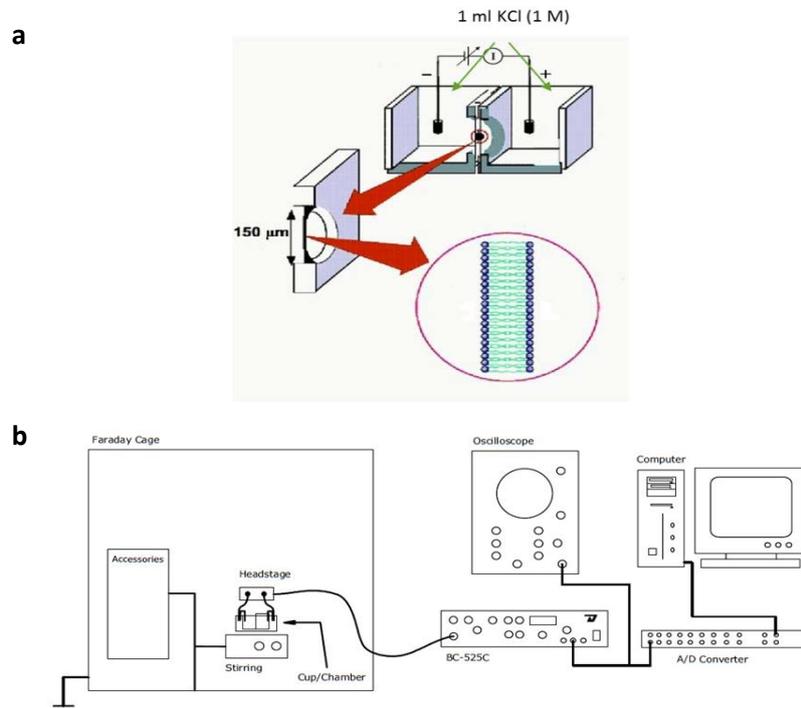


Figure 2.1 : a. Les deux cellules sont remplies d'un électrolyte et la bicouche est formée sur le trou qui les sépare. Une électrode est placée dans chacun des deux compartiments et une tension est appliquée. b. Schéma du montage d'une expérience d'électrophysiologie sur des BLM (Corporation 1999-2000).

La visualisation des signaux, ainsi que le traitement des données sont assurés par le logiciel *Igor Pro*. En fonctionnement normal, la cage de Faraday est posée sur une table anti-vibration (sur coussins d'air). Une des parois extérieures de la cellule est percée d'une fenêtre d'observation qui permet de contrôler le dépôt des lipides et la formation de la bicouche avec une lunette binoculaire.

La nature du convertisseur courant-potentiel dépend de l'amplificateur utilisé. Nous utilisons un amplificateur dit « de bicouches », commercialisé par la société *Biologic* (Grenoble) sous le nom BLM – 120. Dans le BLM – 120, le convertisseur de courant est une résistance calibrée (1 G Ω) aux bornes de laquelle on mesure le potentiel (1 pA correspond alors à 1 mV).

La cuve sur laquelle se trouve le trou de 150 μm est d'abord prétraitée avec une toute petite quantité d'une solution de lipides dans le décane. Après 30 minutes de séchage, la cuve est déposée dans l'emplacement qui lui est réservé.

Chaque compartiment de la cellule de mesure est rempli de 1 ml d'une solution d'électrolyte (pour nos expériences KCl 1M, Hepes 5 mM, pH 7). Une gouttelette de solution de lipides dans le décane est étalée devant le trou selon la méthode « *painting* » (Mueller, Rudin *et al.* 1962). Ensuite, les électrodes Ag/AgCl sont placées dans chacun des deux compartiments, une tension de -100 mV est appliquée et le courant électrique est observé et enregistré.

Après amincissement de la gouttelette de lipides sous l'action de la capillarité et des forces Van der Waals, une bicouche de lipides se forme. Sa formation, ainsi que son amincissement (drainage du décane) peuvent être suivis directement sur l'ordinateur en temps réel *via* la mesure de la capacité de la bicouche, ce qui nous donne accès à l'épaisseur de la membrane.

Le phospholipide employé est le 1,2 diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (diphytanoyl, *AvantiPolar Lipids*, figure 2.2) en solution dans du décane à une concentration fixée à 1% en masse par volume (g/ml). Ce lipide permet l'obtention de membranes lipidiques assez épaisses (~5 nm) et résistantes à l'insertion d'autres molécules dans la bicouche après sa formation. L'épaisseur de la bicouche est un facteur important pour l'insertion des molécules.

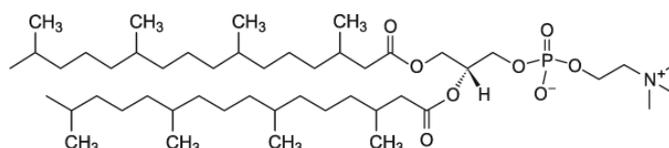


Figure 2.2 : Le 1,2 diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (diphytanoyl) est un lipide branché, utilisé pour former des films noirs. La figure est tirée du site *web d'AvantiPolar Lipids*. Il possède une tête polaire d'aire environ 5 nm² et deux chaînes hydrophobes d'environ 2-3 nm de longueur.

3. Culture cellulaire et protocoles détaillés des expériences réalisées avec des cellules

3.a. Culture cellulaire des CHO

Les cellules CHO-K1 sauvages déficientes en xylosetransferase (ATCC) sont cultivées dans du DMEM complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), de la pénicilline (100 000 UI/L), de la streptomycine (100 000 UI/L) et de l'amphotéricine B (1 mg/mL) sous atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ à 37 °C.

3.b. Test de cytotoxicité

La non toxicité du AMP a été vérifiée à l'aide du kit « Cell Counting Kit-8 » (Dojindo). Le comptage des cellules viables est réalisé *via* un test colorimétrique utilisant l'activité des deshydrogénases cellulaires (figure 3.1). Le réactif du kit CCK-8 contient un sel de tétrazolium, le WST-8 et un transporteur d'électron intermédiaire, le 1-méthoxy PMS qui va se localiser au niveau des membranes cellulaires. Dans les cellules vivantes, le NAD(P)H formé par les deshydrogénases pourra réduire le 1-méthoxy PMS qui réduira à son tour le WST-8 en formazan qui possède une bande d'absorption à 450 nm.

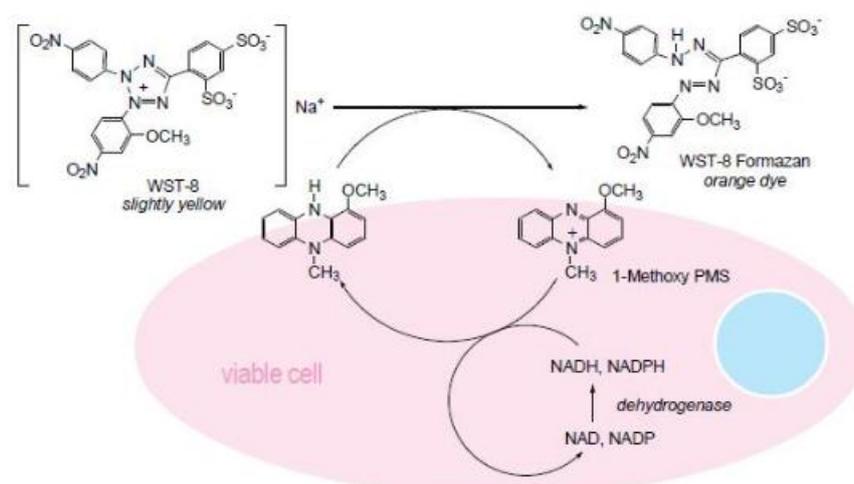


Figure 3.1 : Le principe du test de cytotoxicité CCK-8. L'image est tirée du site web de *Dojindo Molecular Technologies*.

3.c. Expérience de fuite de CFDA

Les cellules ($\sim 2,5 \cdot 10^6$ cellules/ml) sont placées dans deux tubes (dont un témoin, jamais en contact avec l'AMP) et protégées de la lumière (tubes "habillés" avec du papier aluminium). La 5-CFDA (*Sigma Aldrich*), solubilisée dans l'acétone à 50 mM et diluée dans un *binding buffer* (1 mM HEPES, 14 mM NaCl et 0,25 mM CaCl₂ ; pH 7,5), est ajoutée à 500 μ M (concentration finale) dans chacun des deux tubes et le tout est placé dans un bain – marie à 37°C pendant ~ 20 min. Les cellules sont ensuite lavées 5 fois dans du PBS afin d'éliminer la CFDA non entrée dans les cellules. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du PBS pour revenir au volume initiale - et donc à une concentration proche de la concentration initiale (il est estimé que 5% des cellules sont perdues au cours des lavages) et du 15C8 10azo ($50 \cdot 10^{-12}$ g AMP/cellule) en conformation *trans* est ajouté dans un de deux tubes.

La centrifugation des aliquotes prélevées se fait à 3000 *rpm* pendant 5 minutes avec une centrifugeuse *MSE Micro Centaur*.

3.d. Expérience d'internalisation du peptide R6L3

- **Préparation de l'échantillon (Walrant 2011)**

Les cellules cultivées dans des plaques *NUNC* 96 puits sont lavées 2 fois avec du HBSS. Le polymère est solubilisé dans un petit volume de méthanol et dilué dans du DMEM (10 mg/ml). Un type d'expérience consistait à ajouter l'AMP dans chaque puits contenant des cellules CHO adhérentes (à 0,15 ou à 1,19 μ M) pendant 30 minutes (37°C) puis d'incuber avec le peptide (à 0,1 μ M) pendant une heure. Un autre type d'expérience était d'incuber l'ensemble (l'AMP et le R6L3 ajoutés dans les puits des cellules simultanément), aux mêmes concentrations et toujours à 37°C, pendant une heure. Le tout est réalisé sous une lampe rouge, afin de limiter le changement de conformation de l'AMP. Notons ici que le R6L3 utilisé possède une étiquette de 4 glycines et une biotine à son extrémité N-terminale pour des raisons qui seront abordées par la suite.

Après l'incubation, les cellules sont lavées plusieurs fois pour éliminer le peptide en solution ou faiblement lié aux cellules. Cependant, une certaine quantité de peptide peut rester associé à la membrane cellulaire par des interactions fortes ; de la trypsine est ajoutée pour digérer le peptide, permettant en aussi de détacher les cellules adhérentes du fond des puits. D'éventuelles fortes interactions électrostatiques entre le peptide (chargé +) et l'AMP (chargé -) pourraient gêner la digestion du peptide par la trypsine. Afin d'écranter ces interactions, du NaCl 1M a été ajouté dans le tampon HBSS de lavage. Par la suite, les cellules sont récupérées dans un tube, centrifugées et lavées.

La quantification du peptide inséré dans les cellules est faite par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La détection du peptide est directe, sans introduction de sondes qui pourraient perturber le phénomène. Cependant la spectrométrie de masse n'est pas une méthode quantitative en soi : la quantification est rendu possible grâce à l'utilisation d'un étalon interne. Cet étalon dans notre cas correspond à la même séquence d'acides aminés que le R6L3, garantissant ainsi une ionisation identique en spectrométrie de masse. Les deux peptides, internalisé et étalon, possèdent tous les deux une étiquette constituée de quatre résidus Gly. Sur le peptide étalon, ces résidus sont bi-deutérés alors que sur le peptide internalisé, ces résidus sont non deutérés. Ainsi, sur le spectre de masse obtenu, les massifs isotopiques correspondant aux deux peptides seront séparés par huit unités de masse. Le rapport des aires des deux massifs permet de calculer la quantité de peptide internalisé.

Une quantité connue d'étalon interne est ajoutée et les cellules sont lysées, à 100 °C pendant 15 minutes, pour que les protéases cellulaires soient dénaturées et afin d'exposer les peptides internalisés et étalons aux composants du lysat dans les mêmes conditions. Les lysats sont centrifugés et les surnageant contenant les peptides récupérés. Des billes magnétiques fonctionnalisées à la streptavidine sont ajoutées et laissées en présence du lysat pendant une heure : les peptides internalisé et étalon portent tous les deux une biotine à leur extrémité N-terminale, ce qui permettra leur capture grâce à la forte interaction biotine/streptavidine. Les billes sont ensuite lavées (voir protocole ci - dessous) et les peptides capturés sont relargués par l'ajout de matrice HCCA acide.

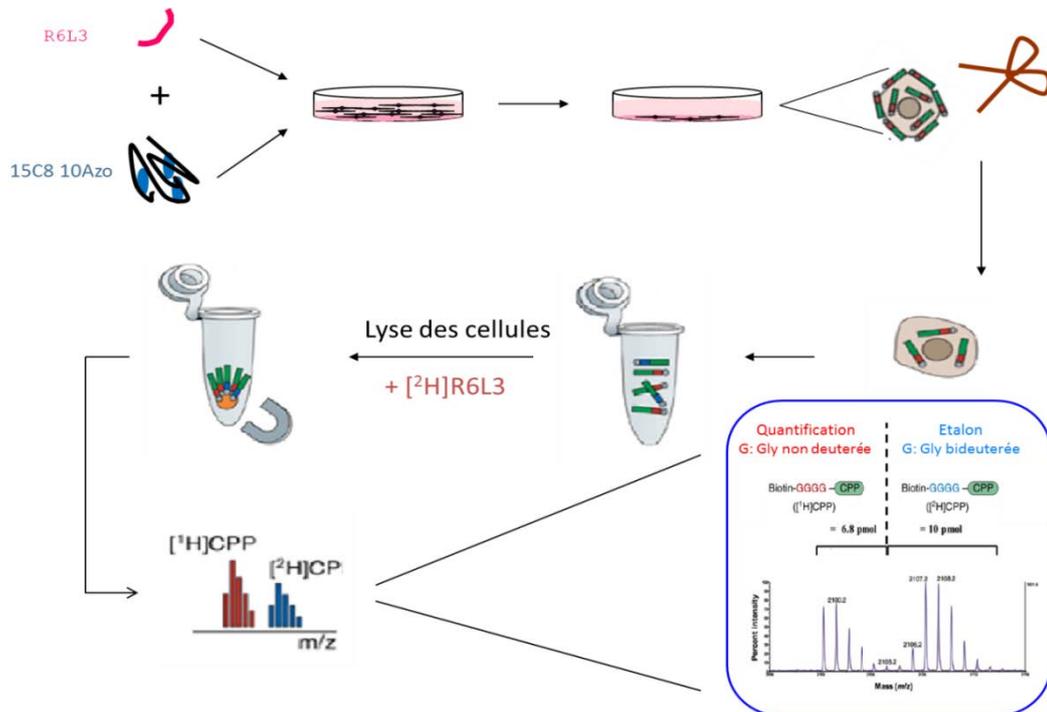


Figure 3.2 : Le protocole utilisé pour la détection du R6L3 internalisé dans les cellules (protocole dérivé du protocole de quantification par MS mis en place au sein du laboratoire (Burlina, Sagan *et al.* 2006)).

- **Lavage des billes magnétiques et capture des peptides**

500 μL de solution de pronase (100 mM Tris HCl, 0.5 mg/mL pronase à pH = 7,5) sont ajoutés et après 5 min à 37 °C, la plaque est placée à 4 °C. Le pronase est inhibé par addition de 100 μL d'inhibiteur de protéase Complete (Roche), 7x concentré et 100 μL de BSA 1mg/mL. Le contenu de chaque puits est transféré dans un microtube de 1,5 mL. Les puits sont lavés avec 500 μL de Tris HCl 50 mM, pH = 7,5 pour récupérer les cellules éventuellement restées dans le puits et le contenu de chaque puits est transféré dans le microtube correspondant. Les tubes sont centrifugés pendant 2 min à 640 *g* (3 000 r.p.m. pour une centrifugeuse Sanyo MSE Micro Centaur). Les surnageants sont éliminés et les culots sont resuspendus dans 1 mL de tampon A (50 mM Tris HCl, 0,1 mg/mL BSA à pH = 7,5). Les tubes sont à nouveau centrifugés 2 min à 640 *g* et les surnageants éliminés. 150 μL de solution de lyse (0.3% Triton X-100, 1 M NaCl) contenant la quantité voulue de

peptide étalon sont ajoutés aux culots et les tubes sont immédiatement placés à 100 °C pendant 15 min, un précipité blanc apparaît. Les lysats cellulaires sont refroidis à 4 °C et centrifugés pendant 5 min à 7 080 *g* (soit 10 000 r.p.m. pour une centrifugeuse Sanyo MSE Micro Centaur). Les surnageants sont transférés dans des microtubes de 1,5 mL et les précipités sont lavés avec 850 µL de tampon A puis centrifugés à nouveau pendant 5 min à 7 080 *g*. Les surnageants sont récupérés et ajoutés aux premiers. 20 µL de suspension de billes magnétiques lavées sont ajoutés par tube et laissés pendant 60 min sous légère agitation. Les tubes sont alors placés sur un portoir aimanté afin de concentrer les billes magnétiques qui sont lavées successivement par 200 µL de tampon A - 2 fois, 200 µL de tampon B (50 mM Tris HCl, 0,1 mg/mL BSA, 0,1 % SDS à pH = 7,5) - 2 fois, 200 µL de tampon C (50 mM Tris HCl, 0,1 mg/mL BSA, 1 M NaCl à pH = 7,5) - 2 fois, 200 µL, puis 100 µL et enfin 50 µL d'eau. Les billes sont ensuite saturées par l'ajout de 50 µL d'une solution de biotine à 8 µM. Les billes sont finalement lavées par 50 µL d'un mélange H₂O/MeCN (1:1). Enfin, le peptide est élué des billes magnétiques par l'ajout de 3 µL de matrice HCCA (solution saturée de HCCA dans H₂O/MeCN (1:1), 0,1 % TFA). Après immobilisation sur l'aimant, 1,5 µL du surnageant sont prélevés et déposés sur la plaque MALDI. Les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflecteur positif sur un spectromètre de masse Voyager DEPro (Applied Biosystems). Sur le spectre de masse, le rapport des aires des massifs correspondant aux peptides internalisés et étalon permet d'accéder à la quantité de peptide internalisé.

3.e. Expérience ITC

Les concentrations utilisées sont de 0,5 mM pour le R6L3 (dilué dans du DMEM à partir d'un stock à 1 mM dans H₂O) et 0,037 mM (37 µM) pour l'AMP (dans du DMEM), la température est fixée à 37° et le délai entre les injections (25 au total) fixé à 300 s.

Références :

- Alberts B JA, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Molecular Biology of the Cell. 4 ed. New York: Garland Science; 2002.
- Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. Trends in pharmacological sciences 1994;15(7):215-220.
- Almgren M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. Biochimica et biophysica acta 2000;1508(1-2):146-163.
- Alpadi K, Kulkarni A, Comte V, Reinhardt M, Schmidt A, Namjoshi S, Mayer A, Peters C. Sequential analysis of trans-SNARE formation in intracellular membrane fusion. PLoS biology 2012;10(1):e1001243.
- Andreoli Tea. Membrane Physiology. 2 ed; 1987.
- Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome electroformation. Faraday Discussions of the Chemical Society 1986;81:303-311.
- Armstrong JK, Wenby RB, Meiselman HJ, Fisher TC. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. Biophysical journal 2004;87(6):4259-4270.
- Arrio-Dupont M, Cribier S, Foucault G, Devaux PF, d'Albis A. Diffusion of fluorescently labeled macromolecules in cultured muscle cells. Biophysical journal 1996;70(5):2327-2332.
- Baba T, Toshima Y, Minamikawa H, Hato M, Suzuki K, Kamo N. Formation and characterization of planar lipid bilayer membranes from synthetic phytanyl-chained glycolipids. Biochimica et biophysica acta 1999;1421(1):91-102.
- Bacia K, Schwille P, Kurzchalia T. Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102(9):3272-3277.
- Badi N, Auvray L, Guégan P. Synthesis of Half-Channels by the Anionic Polymerization of Ethylene Oxide Initiated by Modified Cyclodextrin. Advanced Materials 2009;21(40):4054-4057.
- Ball V, Maechling C. Isothermal microcalorimetry to investigate non specific interactions in biophysical chemistry. International journal of molecular sciences 2009;10(8):3283-3315.

- Banerjee RK, Datta AG. Proteoliposome as the model for the study of membrane-bound enzymes and transport proteins. *Molecular and cellular biochemistry* 1983;50(1):3-15.
- Barelli H, Antony B. Cell biology: Detached membrane bending. *Nature* 2009;458(7235):159-160.
- Baumgart T, Hess ST, Webb WW. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 2003;425(6960):821-824.
- Bayley H. Ion channels get flashy. *Nature chemical biology* 2006;2(1):11-13.
- Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 2006;1758(9):1529-1539.
- Benincasa M, Pacor S, Wu W, Prato M, Bianco A, Gennaro R. Antifungal activity of amphotericin B conjugated to carbon nanotubes. *ACS nano* 2011;5(1):199-208.
- Bisby RH, Mead C, Morgan CG. Wavelength-programmed solute release from photosensitive liposomes. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;276(1):169-173.
- Bloom M, Evans E, Mouritsen OG. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Quarterly reviews of biophysics* 1991;24(3):293-397.
- Boesze-Battaglia K, Schimmel R. Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *The Journal of experimental biology* 1997;200(Pt 23):2927-2936.
- Breeuwer P, Drocourt JL, Bunschoten N, Zwietering MH, Rombouts FM, Abee T. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and environmental microbiology* 1995;61(4):1614-1619.
- Briggs J, Chung H., Caffrey, M. The Temperature-Composition Phase Diagram and Mesophase Structure Characterization of the Monoolein/Water System. *J Phys II France* 1996;6:723-751.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews Microbiology* 2005;3(3):238-250.

- Burlina F, Sagan S, Bolbach G, Chassaing G. A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature protocols* 2006;1(1):200-205.
- Callan-Jones A, Sorre B, Bassereau P. Curvature-driven lipid sorting in biomembranes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011;3(2).
- Campelo F, Malhotra V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annual review of biochemistry* 2012;81:407-427.
- Cao Z, Zhang L, Jiang S. Superhydrophilic zwitterionic polymers stabilize liposomes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2012;28(31):11625-11632.
- Cevc G, Marsh, D. Phospholipid bilayers. New York, USA; 1987.
- Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta* 2006;1758(9):1184-1202.
- Chan YH, Boxer SG. Model membrane systems and their applications. *Current opinion in chemical biology* 2007;11(6):581-587.
- Chang WK, Wimley WC, Searson PC, Hristova K, Merzlyakov M. Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* 2008;1778(10):2430-2436.
- Chevallier E, Monteux C, Lequeux F, Tribet C. Photofoams: remote control of foam destabilization by exposure to light using an azobenzene surfactant. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2012;28(5):2308-2312.
- Chrai SS, Murari, R., Ahmad, I. Liposomes (a review). Part two: Drug delivery systems. *BioPharm* 2002;15(1):40, 42-43, 49.
- Ciancaglini P, Simão AMS, Bolean M, Millán JL, Rigos CF, Yoneda JS, Colhone MC, Stabeli RG. Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys Rev* 2012;4(1):67-81.
- Corporation WI. The design and use of a planar lipid bilayer workstation. Warner BC-525C user's manual; 1999-2000.
- Cullis P, Fenske, D. Model Membrane Systems as Drug Delivery Vehicles. *Biol Skr Dan Vid Selsk* 1998;49:201-208.
- Dam TK, Torres M, Brewer CF, Casadevall A. Isothermal titration calorimetry reveals differential binding thermodynamics of variable region-identical antibodies differing

- in constant region for a univalent ligand. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(46):31366-31370.
- Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 1991;30(5):1163-1173.
- Diab C, Tribet C, Gohon Y, Popot JL, Winnik FM. Complexation of integral membrane proteins by phosphorylcholine-based amphipols. *Biochimica et biophysica acta* 2007;1768(11):2737-2747.
- Eckler SA, Kuehn R, Gautam M. Deletion of N-terminal rapsyn domains disrupts clustering and has dominant negative effects on clustering of full-length rapsyn. *Neuroscience* 2005;131(3):661-670.
- Evans E, Needham, D. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions. *Journal of Physical Chemistry* 1987;91(16):4219-4228.
- Evans T. Transformation and microinjection. In: Ambros V, editor. *Wormbook. The C. elegans Research Community* ed; 2006.
- Farge E, Devaux PF. Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophysical journal* 1992;61(2):347-357.
- Farsad K, De Camilli P. Mechanisms of membrane deformation. *Current opinion in cell biology* 2003;15(4):372-381.
- Fenske DB, Chonn A, Cullis PR. Liposomal nanomedicines: an emerging field. *Toxicologic pathology* 2008;36(1):21-29.
- Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 2002;419(6905):361-366.
- Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85(18):6949-6953.
- Gaitzsch J, Appelhans D, Grafe D, Schwille P, Voit B. Photo-crosslinked and pH sensitive polymersomes for triggering the loading and release of cargo. *Chemical Communications* 2011;47(12):3466-3468.
- Galli T, Martinez-Arca S, Paumet F. Mécanisme de la fusion membranaire. *MEDECINE/SCIENCES* 2002;18(11):1113 - 1119.

- Gao F, Han X, Wu J, Zheng S, Shang Z, Sun D, Zhou R, Li B. A heat-activated calcium-permeable channel - Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channel 6 - is involved in heat shock responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2012;70(6):1056-1069.
- Garcia-Saez AJ, Chiantia S, Salgado J, Schwille P. Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM. *Biophysical journal* 2007;93(1):103-112.
- Garrison SR, Dietrich A, Stucky CL. TRPC1 contributes to light-touch sensation and mechanical responses in low-threshold cutaneous sensory neurons. *Journal of neurophysiology* 2012;107(3):913-922.
- Gohon Y, Giusti F, Prata C, Charvolin D, Timmins P, Ebel C, Tribet C, Popot JL. Well-defined nanoparticles formed by hydrophobic assembly of a short and polydisperse random terpolymer, amphipol A8-35. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2006;22(3):1281-1290.
- Golzio M, Escoffre JM, Portet T, Mauroy C, Teissie J, Dean DS, Rols MP. Observations of the mechanisms of electromediated DNA uptake--from vesicles to tissues. *Current gene therapy* 2010;10(4):256-266.
- Graham TR, Kozlov MM. Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Current opinion in cell biology* 2010;22(4):430-436.
- Guidotti G. The composition of biological membranes. *Archives of internal medicine* 1972;129(2):194-201.
- Hasper HE, de Kruijff B, Breukink E. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry* 2004;43(36):11567-11575.
- Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3 ed; 2001.
- Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *Journal of microbiological methods* 2003;52(3):379-388.
- Hou Q, Gilbert J, Man HY. Homeostatic regulation of AMPA receptor trafficking and degradation by light-controlled single-synaptic activation. *Neuron* 2011;72(5):806-818.
- Huang HW. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 2000;39(29):8347-8352.

- Huin C, Le Gall T, Barteau B, Pitard B, Montier T, Lehn P, Cheradame H, Guegan P. Evidence of DNA transfer across a model membrane by a neutral amphiphilic block copolymer. *The journal of gene medicine* 2011;13(10):538-548.
- Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rozycki B. Membrane budding. *Cell* 2010;143(6):875-887.
- Israelachvili JN. *Intermolecular and Surface Forces*. 2 ed: Academic Press; 1992.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC. Membrane fusion. *Cell* 2003;112(4):519-533.
- Jain MK. *Introduction to biological membranes*. USA: John Wiley & sons; 1988.
- Kasson PM, Lindahl E, Pande VS. Atomic-resolution simulations predict a transition state for vesicle fusion defined by contact of a few lipid tails. *PLoS computational biology* 2010;6(6):e1000829.
- Kasson PM, Pande VS. Control of Membrane Fusion Mechanism by Lipid Composition: Predictions from Ensemble Molecular Dynamics. *PLoS computational biology* 2007;3(11):e220.
- Kocer A, Walko M, Meijberg W, Feringa BL. A light-actuated nanovalve derived from a channel protein. *Science* 2005;309(5735):755-758.
- Kragh-Hansen U, le Maire M, Moller JV. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. *Biophysical journal* 1998;75(6):2932-2946.
- Kümmel D, Krishnakumar SS, Radoff DT, Li F, Giraudo CG, Pincet F, Rothman JE, Reinisch KM. Complexin cross-links prefusion SNAREs into a zigzag array. *Nature structural & molecular biology* 2011;18(8):927-933.
- Kuzmin PI, Zimmerberg J, Chizmadzhev YA, Cohen FS. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(13):7235-7240.
- Ladavière C, Tribet C, Cribier S. Lateral Organization of Lipid Membranes Induced by Amphiphilic Polymer Inclusions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2002;18(20):7320-7327.
- Laub KR, Witschas K, Blicher A, Madsen SB, Luckhoff A, Heimburg T. Comparing ion conductance recordings of synthetic lipid bilayers with cell membranes containing TRP channels. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1818(5):1123-1134.
- Leterrier F, Gary-Bobo, Cl. *Biologie Membranaire*. Paris, France; 1989.

- Li F, Pincet F, Perez E, Giraudo CG, Taresté D, Rothman JE. Complexin activates and clamps SNAREpins by a common mechanism involving an intermediate energetic state. *Nature structural & molecular biology* 2011;18(8):941-946.
- Lipowsky R. Domain-induced budding of fluid membranes. *Biophysical journal* 1993;64(4):1133-1138.
- Liu XM, Yang B, Wang YL, Wang JY. Photoisomerisable cholesterol derivatives as photo-trigger of liposomes: effect of lipid polarity, temperature, incorporation ratio, and cholesterol. *Biochimica et biophysica acta* 2005;1720(1-2):28-34.
- Lorin, Aur, lien, Flore, Christelle, Thomas, Annick, Brasseur, Robert. Les liposomes : description, fabrication et applications. Gembloux, BELGIQUE: Faculté universitaire des sciences agronomiques; 2004.
- Marra J, Israelachvili J. Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous electrolyte solutions. *Biochemistry* 1985;24(17):4608-4618.
- Mathivet L, Cribier S, Devaux PF. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophysical journal* 1996;70(3):1112-1121.
- McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 2005;438(7068):590-596.
- Meiser A, Sancho C, Krijnse Locker J. Plasma membrane budding as an alternative release mechanism of the extracellular enveloped form of vaccinia virus from HeLa cells. *Journal of virology* 2003;77(18):9931-9942.
- Minton AP. Effects of excluded surface area and adsorbate clustering on surface adsorption of proteins. II. Kinetic models. *Biophysical journal* 2001;80(4):1641-1648.
- Minton AP. Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophysical journal* 2005;88(2):971-985.
- Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 1962;194:979-980.
- Palmer LR, Chen T, Lam AM, Fenske DB, Wong KF, MacLachlan I, Cullis PR. Transfection properties of stabilized plasmid-lipid particles containing cationic PEG lipids. *Biochimica et biophysica acta* 2003;1611(1-2):204-216.

- Papadopoulos A, Vehring S, Lopez-Montero I, Kutschenko L, Stockl M, Devaux PF, Kozlov M, Pomorski T, Herrmann A. Flippase activity detected with unlabeled lipids by shape changes of giant unilamellar vesicles. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(21):15559-15568.
- Peetla C, Stine A, Labhasetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Molecular pharmaceutics* 2009;6(5):1264-1276.
- Popot JL, Althoff T, Bagnard D, Baneres JL, Bazzacco P, Billon-Denis E, Catoire LJ, Champeil P, Charvolin D, Cocco MJ, Cremel G, Dahmane T, de la Maza LM, Ebel C, Gabel F, *et al.* Amphipols from A to Z. *Annual review of biophysics* 2011;40:379-408.
- Porcelli F, Buck B, Lee DK, Hallock KJ, Ramamoorthy A, Veglia G. Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(44):45815-45823.
- Prinz WA, Hinshaw JE. Membrane-bending proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2009;44(5):278-291.
- Pucadyil TJ, Schmid SL. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* 2009;325(5945):1217-1220.
- Rausch JM, Marks JR, Rathinakumar R, Wimley WC. Beta-sheet pore-forming peptides selected from a rational combinatorial library: mechanism of pore formation in lipid vesicles and activity in biological membranes. *Biochemistry* 2007;46(43):12124-12139.
- Reinhardt R, Lindemann B, Anner BM. Leakage-channel conductance of single (Na⁺ + K⁺)-ATPase molecules incorporated into planar bilayers by fusion of liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1984;774(1):147-150.
- Rief M, Fernandez, J. M., Gaub, H. E. Elastically Coupled Two-Level Systems as a Model for Biopolymer Extensibility. *Physical review letters* 1998;81(21):4764-4767.
- Rodriguez N, Pincet F, Cribier S. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2005;42(2):125-130.
- Roux A, Antony B. The long and short of membrane fission. *Cell* 2008;135(7):1163-1165.
- Sackmann E. The seventh Datta Lecture. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS letters* 1994;346(1):3-16.

- Sato H, Feix JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 2006;1758(9):1245-1256.
- Sebai SC, Cribier S, Karimi A, Massotte D, Tribet C. Permeabilization of lipid membranes and cells by a light-responsive copolymer. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2010;26(17):14135-14141.
- Sebai SC, Milioni D, Walrant A, Alves ID, Sagan S, Huin C, Auvray L, Massotte D, Cribier S, Tribet C. Photocontrol of the translocation of molecules, peptides, and quantum dots through cell and lipid membranes doped with azobenzene copolymers. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;51(9):2132-2136.
- Shi L, Shen Q-T, Kiel A, Wang J, Wang H-W, Melia TJ, Rothman JE, Pincet F. SNARE Proteins: One to Fuse and Three to Keep the Nascent Fusion Pore Open. *Science* 2012;335(6074):1355-1359.
- Siegel DP. Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophysical journal* 1993;65(5):2124-2140.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993;362(6418):318-324.
- Sonesson AW, Callisen TH, Brismar H, Elofsson UM. Adsorption and activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase on hydrophobic and hydrophilic surfaces measured with dual polarization interferometry (DPI) and confocal microscopy. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2008;61(2):208-215.
- Tamzali Y, Borde L, Rols MP, Golzio M, Lyazrhi F, Teissie J. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases. *Equine veterinary journal* 2012;44(2):214-220.
- Tanaka M, Sackmann E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 2005;437(7059):656-663.
- Teissie J, Escoffre JM, Paganin A, Chabot S, Bellard E, Wasungu L, Rols MP, Golzio M. Drug delivery by electropulsation: Recent developments in oncology. *International journal of pharmaceutics* 2012;423(1):3-6.
- Thiele J, Abate AR, Shum HC, Bachtler S, Förster S, Weitz DA. Fabrication of Polymersomes using Double-Emulsion Templates in Glass-Coated Stamped Microfluidic Devices. *Small* 2010;6(16):1723-1727.

- Ti Tien H. *Bilayer Lipid Membranes (BLM) Theory and Practice*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1974.
- Ti Tien H. *Planar Bilayer Lipid Membranes*; 1985.
- Torchilin VP, Trubetskoy VS. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995;16(2–3):141-155.
- Tribet C, Audebert R, Popot JL. Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(26):15047-15050.
- Tribet C, Vial F. Flexible macromolecules attached to lipid bilayers: impact on fluidity, curvature, permeability and stability of the membranes. *Soft Matter* 2008;4(1):68-81.
- Uchegbu IF, Sadiq L, Pardakhty A, El-Hammadi M, Gray AI, Tetley L, Wang W, Zinselmeyer BH, Schätzlein AG. Gene Transfer with Three Amphiphilic Glycol Chitosans—the Degree of Polymerisation is the Main Controller of Transfection Efficiency. *Journal of drug targeting* 2004;12(8):527-539.
- Ungewickell EJ, Hinrichsen L. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Current opinion in cell biology* 2007;19(4):417-425.
- van den Bogaart G, Guzman JV, Mika JT, Poolman B. On the mechanism of pore formation by melittin. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(49):33854-33857.
- van den Bogaart G, Jahn R. Inside insight to membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108(29):11729-11730.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews* 2008;9(2):112-124.
- van Rensen AJ, Wauben MH, Grosfeld-Stulemeyer MC, van Eden W, Crommelin DJ. Liposomes with incorporated MHC class II/peptide complexes as antigen presenting vesicles for specific T cell activation. *Pharmaceutical research* 1999;16(2):198-204.
- Vial F, Cousin F, Bouteiller L, Tribet C. Rate of permeabilization of giant vesicles by amphiphilic polyacrylates compared to the adsorption of these polymers onto large vesicles and tethered lipid bilayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2009;25(13):7506-7513.
- Vial F, Oukhaled AG, Auvray L, Tribet C. Long-living channels of well defined radius opened in lipid bilayers by polydisperse, hydrophobically-modified polyacrylic acids. *Soft Matter* 2007;3(1):75-78.

Vial F, Rabhi S, Tribet C. Association of octyl-modified poly(acrylic acid) onto unilamellar vesicles of lipids and kinetics of vesicle disruption. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2005;21(3):853-862.

Vial F. Perméabilisation contrôlée de membranes lipidiques par des copolymères amphiphiles hydrosolubles stimulables. Paris, France: Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2007.

Walde P, Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular engineering* 2001;18(4):143-177.

Walrant A, Correia I, Jiao CY, Lequin O, Bent EH, Goasdoue N, Lacombe C, Chassaing G, Sagan S, Alves ID. Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochimica et biophysica acta* 2011;1808(1):382-393.

Walrant A. Interactions entre peptides vecteurs et membranes modèles et biologiques. Le cas de trois peptides synthétiques. Paris: Université Pierre et Marie Curie; 2011.

Wang JY, Marks J, Lee KY. Nature of Interactions between PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers and Lipid Membranes: (I) Effect of Polymer Hydrophobicity on Its Ability to Protect Liposomes from Peroxidation. *Biomacromolecules* 2012;13(9):2616-2623.

Wiedemann I, Benz R, Sahl HG. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *Journal of bacteriology* 2004;186(10):3259-3261.

Yuan JM, Chyan CL, Zhou HX, Chung TY, Peng H, Ping G, Yang G. The effects of macromolecular crowding on the mechanical stability of protein molecules. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2008;17(12):2156-2166.

Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *The Biochemical journal* 1993;294 (Pt 1):1-14.

Zhou HX, Rivas G, Minton AP. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annual review of biophysics* 2008;37:375-397.

Et les sites internet:

<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

http://www.bioc.rice.edu/bios576/membrane/membrane_fusion.html

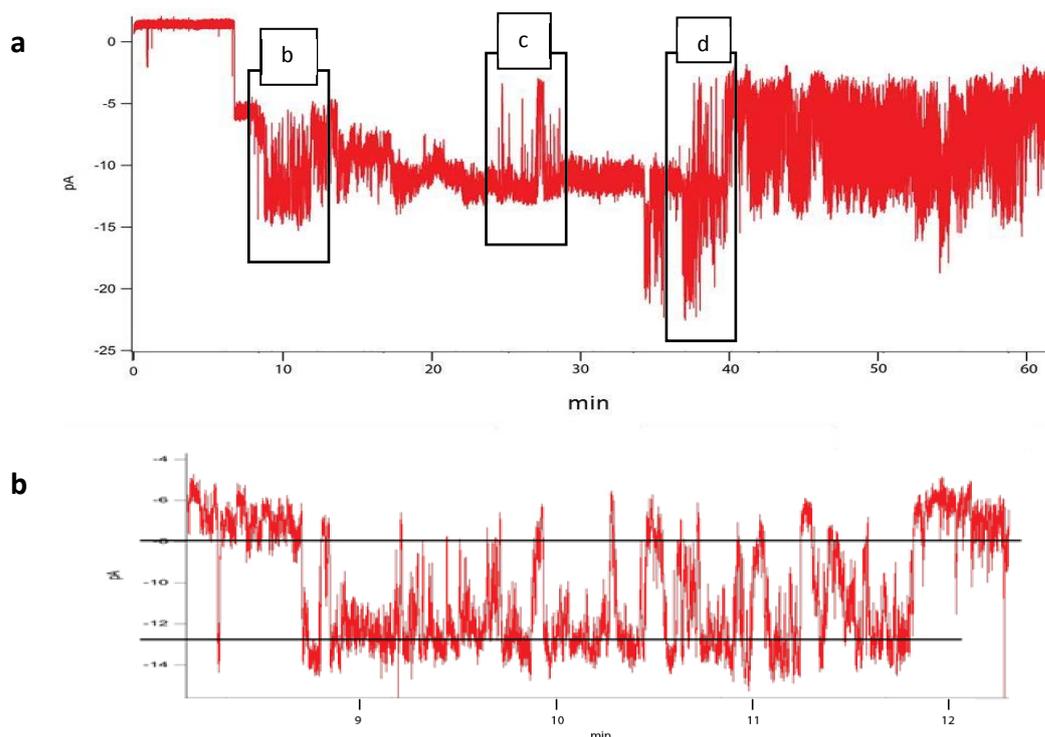
ANNEXE

1. La diversité des résultats obtenus

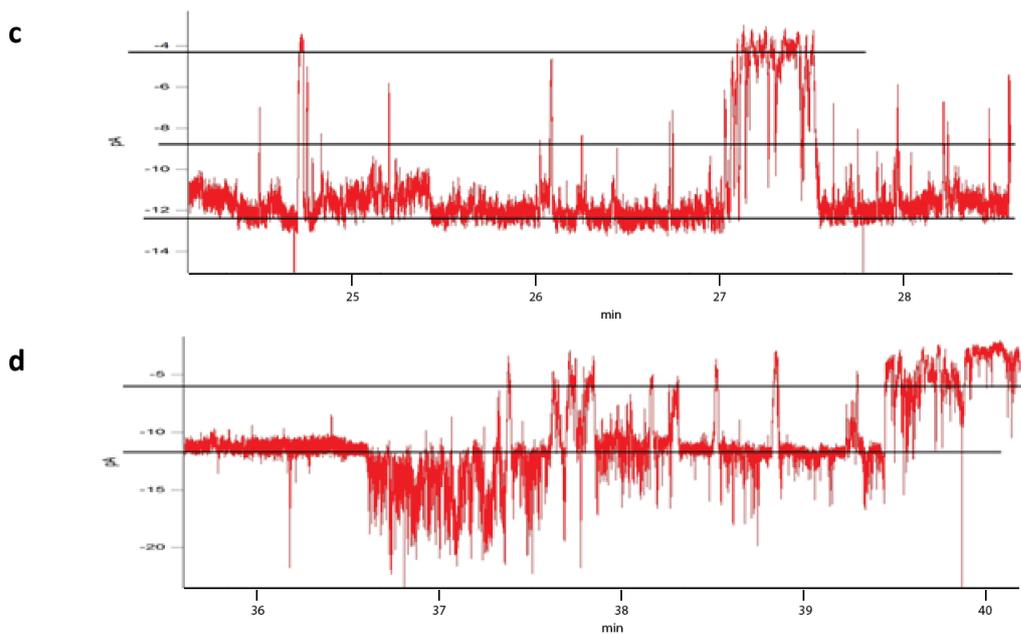
(Résultats non montrés dans le chapitre IV)

→ Des intensités d'ordre de grandeur inférieur :

Le chronoampérogramme de la figure 1.a montre l'évolution du signal pour une bicouche de capacité 64 pF (4,9 nm d'épaisseur), formée en présence de 2 μg de polymère dans 1 ml d'électrolyte. La membrane se perméabilise environ 7 minutes après sa formation et reste perméable jusqu'à la fin de l'enregistrement, avec des parties pendant lesquelles le signal du courant électrique est assez stable. Différents zooms sont montrés sur les figures 1.b, 1.c et 1.d. Les paliers de courants majoritaires sont indiqués par une ligne horizontale. L'allure du profil du signal électrique est assez similaire avec celles vues précédemment ; cependant, les valeurs des courants sont beaucoup plus faibles.



Figures 1.a et 1.b : a. trace électrique obtenue sur une bicouche de 64 pF en présence de trans-AMP (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans le compartiment anodique) – membrane formée en présence de l'AMP – tension appliquée -100mV, b : zoom de la trace électrique de a (la région encadrée b). Des valeurs majoritaires peuvent être distinguées.



Figures 1.c et 1.d : Différents zooms de la trace électrique de a (des régions encadrées). Des valeurs majoritaires peuvent être distinguées.

→ **Des intensités d'ordre de grandeur supérieur :**

La figure 2.a représente le chronoampéromètre correspondant à une bicouche formée en présence de 5 μg d'AMP dans 1 ml d'électrolyte. Elle présente une capacité de 72 pF, correspondant à une épaisseur de 4,4 nm. Après environ 30 min, le signal reste stable à -1280 pA jusqu'à la fin de l'enregistrement (une heure au total). Il faut noter que l'interface graphique sature à -1000 pA ; pourtant, les valeurs peuvent être suivies en temps réel. Des zooms de la partie enregistrée de l'enregistrement total sont montrés aux figures 2.b et 2.c.

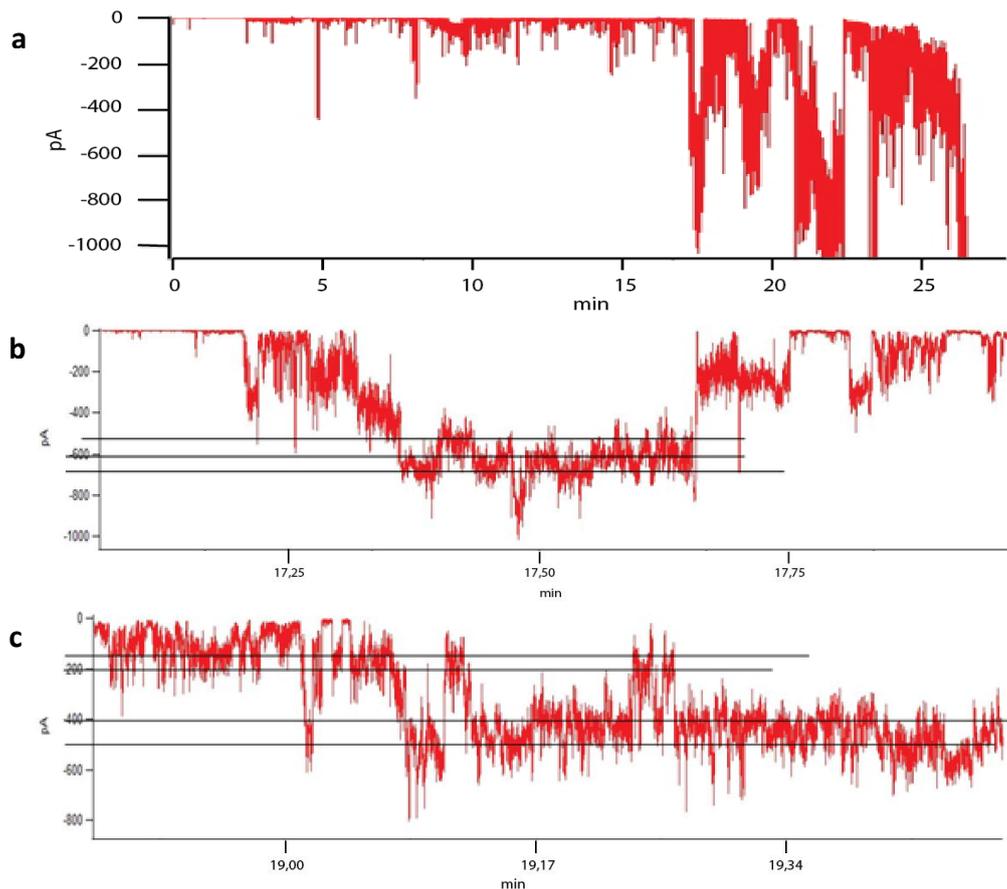


Figure 2 : **a** : trace électrique obtenue sur une bicouche de 72 pF en présence de *trans*-AMP (5 μ g/ml dans le compartiment anodique) – membrane formée en présence de l'AMP – tension appliquée -100mV, **b, c** : différents zooms du signal total montré en a. Des valeurs majoritaires sont distinguées et indiquées à l'aide de lignes horizontales.

Dans ce cas – là, des valeurs importantes de courant apparaissent. Ce qui est important ici est que le comportement et l'évolution du signal est identique à ce qui a été vu dans les résultats du chapitre IV, mais l'ordre de grandeur des valeurs de courant est supérieur.

Annexe 2

Photoresponsive Polymers

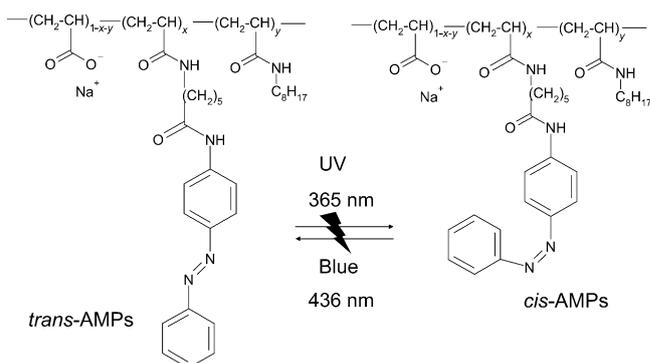
Photocontrol of the Translocation of Molecules, Peptides, and Quantum Dots through Cell and Lipid Membranes Doped with Azobenzene Copolymers**

Sarra C. Sebai, Dimitra Milioni, Astrid Walrant, Isabel D. Alves, Sandrine Sagan, Cécile Huin, Loïc Auvray, Dominique Massotte, Sophie Cribier, and Christophe Tribet*

Permeabilization of lipid membranes is a major challenge for the development of biocides and for improving the delivery of DNA, anticancer agents, and small proteins within the cell cytosol. Effective membrane permeabilization can be achieved by chemical techniques that often involve an intra-membrane assembly of permeabilizing agents such as peptides,^[1–3] amphiphilic molecules, or polymers.^[4,5] Alternative physical techniques are electroporation or microinjection. A present challenge for chemical approaches lies in targeting cells while maintaining cell viability.^[6,7] The development of permeabilizers for the remote control of membrane properties is accordingly in high demand to compete with microinjection, because the former avoids mechanical damage and addresses large cell subsets.

The strategy consists of using so-called “smart” systems, that is, tailoring stimuli-responsive molecules to affect lipid membranes.^[4,8–12] The variation of the pH value has been the major focus for the design of smart bilayers doped with polymers^[11,12] or peptides^[13] with the goal of delivering substances of interest in the late endosomes or targeting acidic tumors.^[14] However, light-responsive systems would offer a more versatile and external trigger. To photocontrol self-assembly and/or interaction with lipid bilayers several authors had recourse to amphiphilic azobenzene derivatives.^[15,16] The best achievements in this field show a modulation of the rate of transmembrane release of small

molecules from liposomes, the membranes of which contain either a pore-forming peptide, gramicidin, conjugated to azobenzene^[17] or an azobenzene-containing lipid.^[18] However, except for highly specific photogating by engineered membrane proteins,^[19] no artificial system (likely less specific than protein gates) enabled phototriggered permeabilization on living cells. So far, in regard to large molecules (e.g. peptides), their pH-controlled passage was essentially achieved using polymer carriers. Herein, we show that azobenzene-modified polymers (AMPs; Scheme 1)^[20] can impart plasma membranes of living cells and vesicles with this desirable photoresponse.



Scheme 1. Structure of AMPs and *cis*–*trans* photoisomerization. Typically $x = 10$ and $y = 15$ mol% (see text and the Supporting Information).

The photocontrolled delivery of a small peptide was tested in CHO mammalian cells. A well-characterized basic peptide, RL9 (RLLRRLRR-NH₂; R = Arg = arginine, L = Leu = leucine), that binds to cell surfaces without crossing membranes^[22] was added to cells and incubated in the presence of AMP, which is predominantly in its *cis* form. *cis*-AMP was prepared as described in the Supporting Information by pre-exposure to UV light (365 nm) so that cells were not exposed to UV light. *trans*-AMP was generated in situ by exposing half of the wells containing cells to blue light (436 nm) for two minutes. Images of cells in Figure 1 a were obtained by using a biotinylated RL9 derivative; the cells were incubated for one hour with either *cis*- or *trans*-AMP and labeled with streptavidine-AlexaFluor488 (see the Experimental Section). The diffuse green fluorescence in samples exposed to blue light (*trans*-AMP) shows a homogeneous internalization that differs from punctuated images

[*] Dr. S. C. Sebai, Dr. C. Tribet
Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR 8640
CNRS-ENS-UPMC

24, rue Lhomond, 75005 Paris (France)
E-mail: christophe.tribet@ens.fr

D. Milioni, Dr. A. Walrant, Dr. I. D. Alves, Dr. S. Sagan,
Prof. S. Cribier
UPMC Univ Paris 06, UMR 7203 CNRS-UPMC-ENS
4, Place Jussieu, 75005 Paris (France)

Dr. C. Huin, Dr. L. Auvray
LAMBE UMR8587, UEVE-CNRS-CEA
Bd F. Mitterrand, 91025 Evry (France)

D. Massotte
IGBMC
1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch (France)

[**] This work was supported by the ANR for the award of Grant photo-channels N° ANR-07-BLAN-0278. The authors thank Déborah Cardoso for providing Figure S4 and F. Pinaud and M. Dahan for providing Qdots.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201106777>.

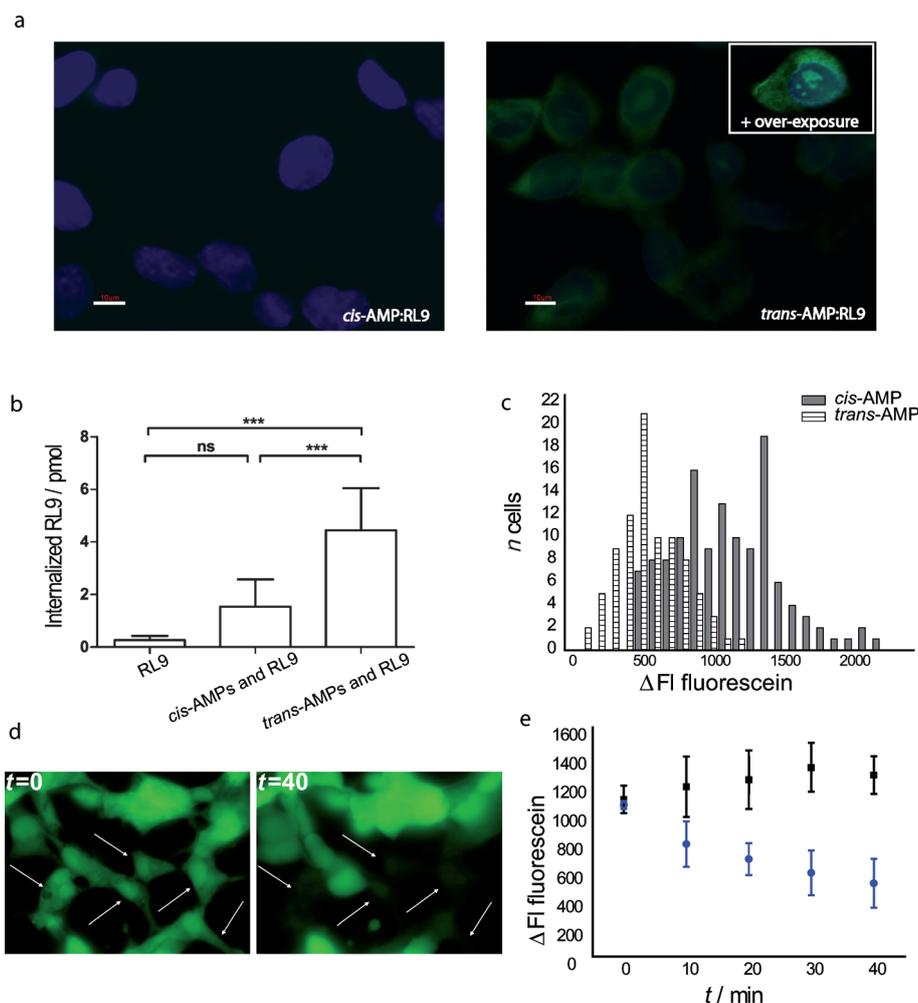


Figure 1. Effect of a *cis*- or *trans*-AMP ($\alpha=0.10$, $\gamma=0.15$ in Scheme 1) on cell permeabilization. *cis*-AMP was added to cells at $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and switched to the *trans* form in half of the wells by exposure to blue light. a) Fluorescence images of CHO cells incubated for one hour with biotinylated RL9 and *cis*- or *trans*-AMP as quoted. Cells were labeled with both streptavidine-AlexaFluor488 (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue) after fixation. Scale bars correspond to $10 \mu\text{m}$. Over-exposed image on the upper right panel shows more clearly the RL9 distribution in the cell upon incubation with *trans*-AMP. b) Quantification of internalized RL9 peptide in CHO cells in the presence of *cis*-AMP or *trans*-AMP (see text for details). Significance was tested using one-way analysis of variance (ANOVA) and subsequent Tukey's multiple comparison test, ns: $p > 0.05$, ***: $p < 0.001$. c) Histogram of CFDA intracytosolic fluorescence intensity over a group of 100 COS cells after 40 min and incubation with *cis*- or *trans*-AMP. d) CFDA-labeled COS cells shown after addition of AMP at $t=0$ min. Cells permeabilized at $t=40$ min are indicated by arrows. e) Release kinetics of CFDA measured by detecting the intracytosolic fluorescence Δ FI (averaged on three independent groups of 10 cells each) during incubation with *cis*-AMP (black squares) or *trans*-AMP (blue dots).

commonly obtained after endocytosis. The fluorescence of cells incubated with *cis*-AMP was significantly lower and is not distinguished from the fluorescence achieved with the parent chain poly(acrylic acid) (PAA), which is devoid of hydrophobic side groups (see controls in the Supporting Information). This observation suggests a markedly lower internalization with *cis*-AMP (or PAA) compared to that achieved with *trans*-AMP. Quantification of internalized RL9 was performed by MALDI-TOF mass spectrometry^[23] (see the Experimental Section for protocols). We can see from Figure 1 b that RL9 internalization is dependent on the AMP

isomerization state. *cis*-AMP does not significantly improve RL9 internalization, compared to control experiments in the absence of AMPs ((1.5 ± 1) vs. (0.3 ± 0.2) pmol of peptide in one million cells, respectively), whereas RL9 is significantly internalized in cells treated with *trans*-AMP. About 4.5 pmoles of RL9 (corresponding to an intracellular concentration of approximately $4 \mu\text{M}$ under the assumption of an intracellular volume of 1 pL) are delivered to the cytosol of cells, an amount similar to the cell-penetrating peptide penetratin.^[24] In the absence of AMPs, the amount of internalized RL9 remained negligible as reported.^[22] We can therefore postulate that *trans*-AMP delivers small peptides to cells in a light-responsive manner. These conditions ensured the absence of toxicity. Toxicity of AMP is not detected up to a polymer concentration of 1 mg mL^{-1} , that is, three orders of magnitude above the present conditions of photopermeabilization (for toxicity assays see the Supporting Information).

Light-driven permeabilization could be nonspecific and share similarities with polymer-triggered pore formation described with hydrophobically modified poly(acrylic acid) devoid of photoresponsive groups.^[9,25] This hypothesis would imply that the permeabilization controlled by AMPs should not markedly depend on a specific protein machinery and should in addition induce photorelease of cytosolic molecules as well as delivery. To confirm this hypothesis, we investigated first the leakage of cell-encapsulated probes. Second, membrane permeabilization in the

absence of proteins was illustrated by experiments on artificial lipid membranes.

Phototriggered release from living cells was demonstrated by using a cell-encapsulated fluorescein probe. Figure 1 d shows viable mammalian COS cells that were grown on glass coverslips and fluorescently labeled with 6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA), a molecule that infuses through the membrane in its ester form and is trapped in cells in its anionic form after hydrolysis by cytosolic esterases (see the Experimental Section). *cis*-AMP was added at time zero after washing out the excess CFDA. No CFDA leakage is observed

in cells exposed to predominantly *cis*-AMP (Figure 1e). In contrast, the leakage curve shown in Figure 1e shows that a gradual drop of the average intracellular fluorescence is triggered by exposure to blue light at time zero, that is, immediately upon formation of *trans*-AMP. The AMPs polarity hence controls the level of fluorescence within the cells. For this kinetics study, however, the reference experiment with *cis*-AMP (no leakage) needed short (1 s) exposures to UV light to preserve predominantly the *cis* state while taking pictures (requiring blue light) of fluorescein distribution (one picture every 10 min). Exposure of cells to UV light is not needed in practice to achieve the photocontrol of leakage: in another set of experiments, fluorescently labeled COS cells were supplemented with preformed *cis*-AMP. Cells were then incubated in the dark for 40 min. In the dark the predominant *cis* form of AMP can be preserved for hours. *trans*-AMP was formed in situ by exposure to blue light at time zero. Figure 1c presents the distribution of the fluorescence intensity of CFDA in cells treated with either *cis*- or *trans*-AMP (population of $N \approx 100$ cells). Cells incubated with *cis*-AMP are characterized by a more intense average fluorescence (FI; $\Delta FI \approx 1100$) compared to cells treated with *trans*-AMP ($\Delta FI \approx 500$). Impermeable and fully loaded cells in the absence of AMPs (as a control) exhibited fluorescence around the average $\Delta FI \approx 1400$. As reflected by the broad fluorescence distribution, heterogeneities exist in the cell population. The significant shift of the mean fluorescence intensity noticeable between cells treated with *cis*-AMP and *trans*-AMP confirms, however, that *trans*-AMP allows a more rapid release of a small anionic soluble dye through the plasma membrane. We then wondered if molecules with larger radii, such as small endogenous soluble proteins, are released. We expressed soluble enhanced green fluorescent protein (eGFP) in COS cells and monitored the fluorescence of the protein in the cell after treatment with AMP. No effects of either *trans*- or *cis*-AMP were detected over an hour, thus suggesting that we are dealing with a size limitation in the permeabilization efficiency (see the Supporting Information). The retention of intracytosolic proteins is of major importance and is consistent with the absence of toxicity of AMP (see the Supporting Information) and preservation of cell viability upon incubation with *trans*-AMP that we previously showed under similar conditions.^[21]

Electrophysiology experiments were then conducted on artificial planar lipid membranes (also called black lipid membranes, BLM). This method enables direct monitoring of membrane permeability by probing current traces across the bilayer. A typical signature for an impermeable membrane is identified by a stable current trace with no associated conductance at a fixed applied voltage of -100 mV across the membrane (signal similar to that shown in Figure 2d in the presence of *cis*-AMP). In contrast, the presence of the same concentration ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) of *trans*-AMP generates variable currents (Figure 2a, b). These signals are characteristic of passage of ions, and abrupt jumps of current from zero to plateau values suggest the fast opening of pores in the bilayer.^[26] Typically, the current varies slightly during the first 15 min after membrane formation (e.g. Figure 2a, part 1). Hence, the membrane likely remains mainly closed at the

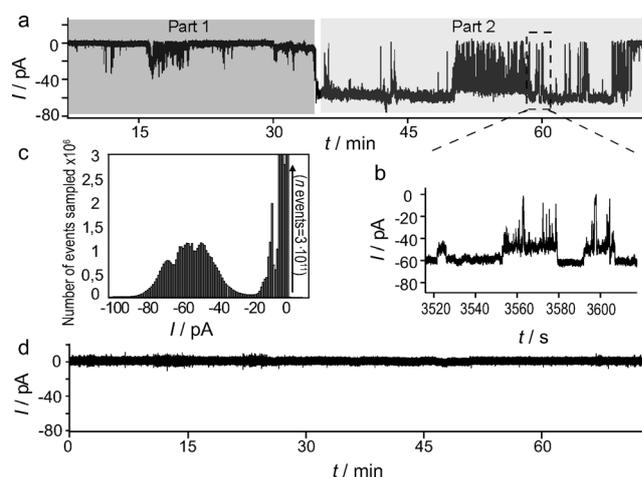


Figure 2. Current-trace measurements through a black lipid membrane monitored after supplementation with AMP in the anodic compartment (pH 7.0). The voltage applied is -100 mV (for detailed experimental conditions see the Supporting Information). a) Incubation with *trans*-AMP. b) Magnification of a region of fluctuations between permeant states. c) Histograms of current occurrence during measurement over approximately one hour for five runs (five different membranes). d) Current trace in the presence of *cis*-AMP at pH 7 showing no permeabilization.

onset of the interaction with *trans*-AMP (see the Supporting Information for current histograms). However, after about 30 min incubation (Figure 2a, part 2) discrete current jumps persist till the end of the run, indicating long-lasting permeant structures. Figure 2c shows the histogram of the times lapsed by the membrane in its “open” states. A broad distribution of currents is revealed, with one peak corresponding to “closed” (0 pA), a second centered at -8 pA, and a third broader peak at about -60 pA. This broad distribution reflects a multiplicity, and/or fluctuation, of structures of *trans*-AMP-formed pores, which we have not investigated yet. The dispersity of opening events suggests that AMPs in their more hydrophobic *trans* form induce dynamic pore formation. Penetration of hydrophobic polymers in the hydrophobic core of a bilayer can scramble lipid organization.^[10] In contrast, preservation of the impermeable state when AMPs were added in their more polar *cis* form suggests a penetration to a lesser extent of *cis*-AMP in the membrane (note that *cis*-AMP was shown however to tightly bind to membranes, as shown for the preparation of giant unilamellar vesicles (GUV); see the Supporting Information).

The structure of polymers significantly affects their interaction with the membrane, and for instance longer polymer chains destabilize lipid bilayers at higher pH values.^[8] We compared AMPs having the same backbone but a slightly different degree of modification with octyl and azobenzene side groups to vary the hydrophobicity of the chains ($x = 10$ or 5 mol% in Scheme 1). Giant vesicles with AMPs inserted in their membrane were prepared by electroformation (see the Supporting Information) in buffer containing the water-soluble fluorescein-labeled probe, dextran-FITC. The diameters of the spherical giant vesicles, called pol-GUVs, ranged from 10 to $80 \mu\text{m}$ (Figure 3a). Pol-GUVs were

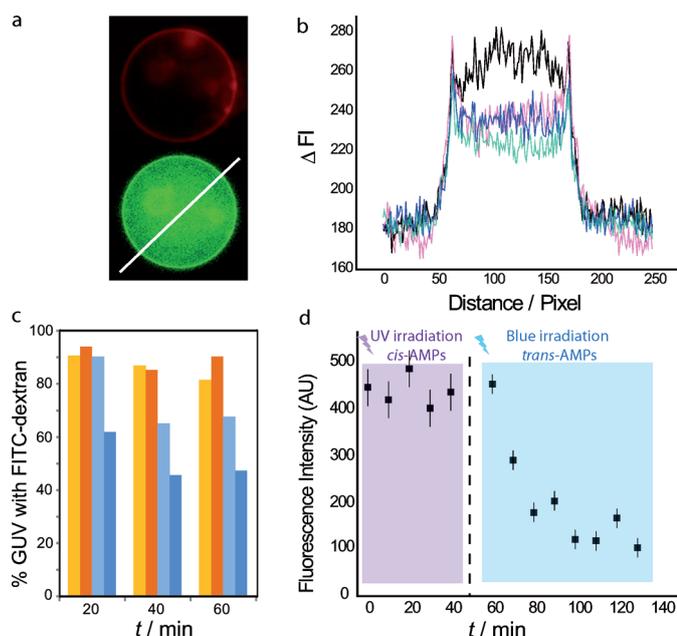


Figure 3. Leakage of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) pol-GUVs revealed by epifluorescence. a) Images of one pol-GUV of approximately 37 μm in diameter with encapsulated QDs (green) at pH 7 and DPPE-rhodamine (DPPE = dipalmitoylphosphatidylethanolamine sulfhodamine; red). b) Fluorescence profile along diameter (white line in (a)) showing the decrease of internal fluorescence from a GUV containing *trans*-AMPs (0.1 g/g AMPs/DOPC ratio) at 0 min (black line), 10 min (red line), 20 min (blue line), and 40 min (green line) after irradiation with blue light. Scale: 10 pixels = 2.2 μm . c) Fractions of dextran-containing pol-GUV in a random sampling of approximately 150 GUVs. Two polymers were used with fractions of azobenzene (x in Scheme 1) of 0.1 (“10azo”) or 0.05 (“5azo”). AMP/DOPC ratios are 0.01 g/g for the yellow (5azo) and light blue (10azo) bars and 0.05 g/g for the red (5azo) and dark blue (10azo) bars. GUVs were diluted under UV light and exposed to blue light at time zero (see text for definition of empty GUVs). d) Delayed release of QDs from an isolated pol-GUV in *cis*-AMP form ($t=0$ min to $t=40$ min, then switched under blue light to the *trans*-AMP form ($t=60$ min to $t=130$ min). Error bars indicate standard deviations calculated from the spatial noise of the fluorescence in both the background and in the GUV.

diluted in the microscope observation chamber under exposure to UV light to reach the predominantly *cis*-AMP state. The fluorescence profile across the vesicle diameter is indicative of the amount of GUV-encapsulated dextran. For simplicity, we distinguished between “empty” and “loaded” GUVs on the basis of the absence or presence of internal fluorescence (the fluorescence intensity threshold for empty GUVs was fixed arbitrarily at the background fluorescence plus twice the noise). In a first set of experiments, pol-GUVs prepared at an AMP/lipid ratio of 0.05 or 0.01 g/g were exposed to blue light (two minutes) just after dilution at pH 7.0. In Figure 3c, the fraction of “dextran-containing” pol-GUV is plotted against increasing incubation times after switching on the light. In the absence of AMP or in the presence of AMP having lower hydrophobicity (here 15 mol% octyl and 5 mol% azobenzene), dextran is essentially kept entrapped in GUV for one hour. In contrast, a significant leakage of dextran is observed after exposure of

pol-GUV containing AMPs with 15% octyl and 10% azobenzene (i.e. the polymer also used in experiments on cells) to blue light. This feature confirms the ability of AMPs to help translocation of large molecules. Membrane integrity was preserved while permeabilization occurred, which was already observed for other hydrophobically modified polymers.^[9,25]

Moreover, we confirmed the possibility for nanometer particles to cross the membrane by performing leakage experiments on isolated GUVs loaded with soluble quantum dots (QDs) as fluorophores (see the Supporting Information, radius 4.2 nm)^[27] and AMP (10 mol% azobenzene) in the membrane. QDs were not bleached during the experiment, which enabled us to record leakage kinetics. Fluorescence intensity across a diameter indicates the presence of soluble QDs as described in reference [28]. Release of QDs upon exposure of pol-GUVs to blue light is shown in Figure 3b,d. In contrast, no leakage was observed during one hour when UV light was constantly shone on pol-GUV (leakage can then be triggered after 60 min; Figure 3d shows a representative example). Hence, we show that AMPs with a high enough density of azobenzene in the chain allow controlled release of macromolecules and nanoparticles such as dextran and QDs.

On the mechanistic side, polymer binding to lipid bilayers is known to affect the local assemblies of lipids and induces, for instance, lateral lipid segregation or membrane thinning.^[4,9] The interaction between amphiphilic copolymers and liposomes is modulated by their apparent hydrophobicity,^[25] which in AMPs is controlled by light.^[21] Destabilization of the membrane occurs upon *cis* to *trans* isomerization of the AMPs, likely owing to deeper penetration of *trans*-azobenzene hydrophobic groups in the bilayer.^[29] AMPs are promising nonspecific tools for controlling the permeability of plasma membranes in physiological conditions (such as in culture medium) and more importantly phototriggered internalization of peptides in living cells. Furthermore, they bring on a control of the opening of artificial pores and passage of macromolecules through lipid bilayers; these latter points will help to study the dynamics of biomimetic gates and delivery systems.

Experimental Section

The Supporting Information describes polymer synthesis, toxicity assays, *cis*–*trans* isomerization, controls, GFP transfection, and details on current measurements.

RL9 (RLLRRLRR-NH₂) cellular uptake: Chinese Hamster Ovary CHO-K1 cells were cultured in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), penicillin (100 000 IU/L), streptomycin (100 000 IU/L), and amphotericin B (1 mgL⁻¹) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. AMP (2 or 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was added to preseeded CHO cells (10⁶) in the presence of RL9 (10 μM) or added to cells 30 min prior to RL9 addition. The order of addition made no difference to the results. Experiments were carried out in triplicate, on different cell batches. RL9 was incubated for one hour at 37°C in both conditions. RL9 cellular uptake was quantified by using the method described by Burlina et al.^[23] except that membrane-bound RL9 was efficiently removed by sequential washing steps made of Hank’s buffered salt solution (HBSS), 1M NaCl/HBSS, trypsin, 1M NaCl/HBSS, HBSS, so that only internalized RL9 would be quantified. Final trypsinization

(5 min at 37°C) resulted in removal of external peptide and the detachment of cells, which were then collected and lysed in Triton X100 (0.3%) and NaCl (1M) at 100°C. Lysates were incubated with streptavidin-coated magnetic beads to extract RL9, which was later eluted with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix and spotted on the MALDI plate. Deuterated RL9 (1.5 pmol) was used as an internal standard, and RL9 in cell lysates was quantified by MALDI-MS.^[22,24] Fluorescence images of the distribution of RL9 biotinylated at the N terminus were recorded after incubation in the same conditions as for RL9 prior to the fixation of cells (4% paraformaldehyde pH 7.4 for 15 min at room temperature), TX100 permeabilization (0.3% for 5 min), and labeling by streptavidine-AlexaFluor488. Nuclei were stained with DAPI. All images were recorded under the same excitation conditions by using the same exposure time and objective (x100 PlanFluor, inverted NikonEclipse microscope).

Carboxyfluorescein diacetate cell encapsulation and release: COS cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and glutamine (2 mM) at 37°C and 5% CO₂. COS cells were preseeded (50000 cells) on MatTek (MatTek Corporation Ashland, MA, USA) glass bottom dishes (35 mm) in complete medium the day before the experiment. 6-carboxyfluorescein diacetate (Sigma Aldrich) was added at 100 μ M in serum-free DMEM for 30 min at 37°C in a CO₂ chamber. Esterases present in the cytoplasm hydrolyze it into encapsulated carboxyfluorescein. Excess CFDA was removed by washing the cells in serum-free DMEM. AMP (2 μ g mL⁻¹) was irradiated with UV light for 15 min in serum-free DMEM (1 mL) and then added to COS cells. For “cis conditions”, cells were maintained in the dark. For “trans conditions”, cells were irradiated for 30 seconds either at 436 nm (or 476 nm through the microscope objective). Fluorescence images were recorded by using a LEICA DM-IRE2 inverted microscope under fixed exposure conditions (typical exposure time 500 ms, binning 2 \times 2). To determine fluorescence intensities, the average background intensity was subtracted from the intensity measured inside the vesicle or the cell for every single frame.

Received: September 23, 2011

Revised: November 9, 2011

Published online: January 19, 2012

Keywords: azobenzenes · membranes · photochromism · polymers · vesicles

- [1] S. M. Butterfield, H. A. Lashuel, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5760–5788; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5628–5654.
 [2] S. B. Fonseca, M. P. Pereira, S. O. Kelley, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 953–964.
 [3] G. Bocchinfuso, A. Palleschi, B. Orioni, G. Grande, F. Formaggio, C. Toniolo, Y. Park, K. S. Hahm, L. Stella, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 550–558.

- [4] W. H. Binder, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3136–3139; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3092–3095.
 [5] H. Cheradame, M. Sassatelli, C. Pomel, A. Sanh, J. Gau, L. Bacri, L. Auvray, P. Guégan, *Macromol. Symp.* **2008**, *261*, 167–181.
 [6] T. M. Allen, P. R. Cullis, *Science* **2004**, *303*, 1818–1822.
 [7] V. P. Torchilin, A. N. Lukyanov, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 259–266.
 [8] J. L. Thomas, D. A. Tirrell, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 336–342.
 [9] C. Tribet, F. Vial, *Soft Matter* **2008**, *4*, 68–81.
 [10] H. Ringsdorf, J. Venzmer, F. M. Winnik, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 323–325; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 315–318.
 [11] T. Chen, D. McIntosh, Y. H. He, J. Kim, D. A. Tirrell, P. Scherrer, D. B. Fenske, A. P. Sandhu, P. R. Cullis, *Mol. Membr. Biol.* **2004**, *21*, 385–393.
 [12] M. A. Yessine, J. C. Leroux, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 999–1021.
 [13] Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev, M. Segala, V. S. Markin, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15340–15345.
 [14] M. An, D. Wijesinghe, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 20246–20250.
 [15] D. B. Liu, Y. Y. Xie, H. W. Shao, X. Y. Jiang, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4470–4472; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4406–4408.
 [16] X. K. Liu, M. Jiang, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3930–3934; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3846–3850.
 [17] C. Stankovic, S. Heinemann, S. Schreiber, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1991**, *1061*, 163–170.
 [18] X. M. Liu, B. Yang, Y. L. Wang, J. Y. Wang, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2005**, *1720*, 28–34.
 [19] R. Numano, S. Szobota, A. Y. Laud, P. Gorostizaa, M. Volgrafe, B. Rouxd, D. Traunere, E. Y. Isacoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6814–6819.
 [20] G. Pouliquen, C. Tribet, *Macromolecules* **2006**, *39*, 373–383.
 [21] S. C. Sebai, S. Cribier, A. Karimi, D. Massotte, C. Tribet, *Langmuir* **2010**, *26*, 14135–14141.
 [22] A. Walrant, I. Correia, C. Y. Jiao, O. Lequin, E. H. Bent, N. Goasdoue, C. Lacombe, G. Chassaing, S. Sagan, I. D. Alves, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2011**, *1808*, 382–393.
 [23] F. Burlina, S. Sagan, G. Bolbach, G. Chassaing, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 200–205.
 [24] C. Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I. D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33957–33965.
 [25] F. Vial, A. G. Oukhaled, L. Auvray, C. Tribet, *Soft Matter* **2007**, *3*, 75–78.
 [26] L. Bacri, A. Benkhaled, P. Guegan, L. Auvray, *Langmuir* **2005**, *21*, 5842–5846.
 [27] F. Pinaud, D. King, H. P. Moore, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6115–6123.
 [28] O. Mertins, N. P. da Silveira, A. R. Pohlmann, A. P. Schroder, C. M. Marques, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2719–2726.
 [29] K. Ishii, T. Hamada, M. Hatakeyama, R. Sugimoto, T. Nagasaki, M. Takagi, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 251–256.

La perméabilisation de la membrane lipidique est actuellement un domaine de recherche important, puisque l'optimisation du transport des petites molécules (comme l'ADN ou les protéines) dans les cellules est nécessaire. Dans ce travail, nous tentons une contribution dans ce domaine en proposant une méthode de perméabilisation contrôlée à l'aide des *Azobenzene Modified Polymers* (AMP). Des copolymères avec un taux d'hydrophobicité modéré ont été montrés dans le passé comme perméabilisant la membrane. Les AMP nous permettraient alors de contrôler cette perméabilisation *via* le contrôle de leur taux d'hydrophobicité (selon la longueur d'onde de la lumière à laquelle ils sont illuminés).

Cette hypothèse a été vérifiée à l'aide des vésicules géantes unilamellaires (GUV) encapsulant des sondes fluorescentes solubles. La cinétique de la fuite de ces sondes en combinaison avec des expériences d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM) nous donne accès à une meilleure caractérisation des structures de perméation créées par l'interaction entre l'AMP et les lipides.

En outre, des expériences ont été réalisées sur des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*). La possibilité de faire rentrer dans les cellules des molécules qui *a priori* n'y sont pas internalisées a été étudiée. Par ailleurs, la fuite de molécules encapsulées dans les cellules et sa cinétique ont été examinées.

Lipid membrane permeabilization is nowadays an important area of research, since the transport of small molecules (like DNA or proteins) into the cells still needs to be improved. In this work, we try to contribute to this study by proposing a non-invasive and easily controlled way of permeabilization by the use of *Azobenzene Modified Polymers* (AMP). Copolymers with balanced amphiphilicity have been previously shown to permeabilize lipid membranes. The AMP would permit us to control the permeabilization of the membrane by controlling their hydrophobicity *via* the radiation exposure wavelength.

This hypothesis has been verified using *Giant Unilamellar Vesicles* (GUV) containing soluble fluorescent probes. The kinetics of the leakage of these probes in combination with electrophysiology experiments in *Black Lipid Membranes* (BLM) give us evidence to go further into the characterization of the permeabilization structures created by the lipid-polymer interactions.

In addition, experiments have been performed on *Chinese Hamster Ovary cells* (CHO). The possibility of using AMP for the delivery of molecules not able to cross the membrane by themselves has been examined and the release of molecules "trapped" in the cells and its kinetics have been studied.