



HAL
open science

Caractérisation de systèmes biologiques à l'échelle nanométrique : études des interactions entre des modèles membranaires et des agents exogènes

Estelle Beauvais

► To cite this version:

Estelle Beauvais. Caractérisation de systèmes biologiques à l'échelle nanométrique : études des interactions entre des modèles membranaires et des agents exogènes. Biomatériaux. Université de Technologie de Compiègne, 2013. Français. NNT : 2013COMP2101 . tel-01067152

HAL Id: tel-01067152

<https://theses.hal.science/tel-01067152v1>

Submitted on 23 Sep 2014

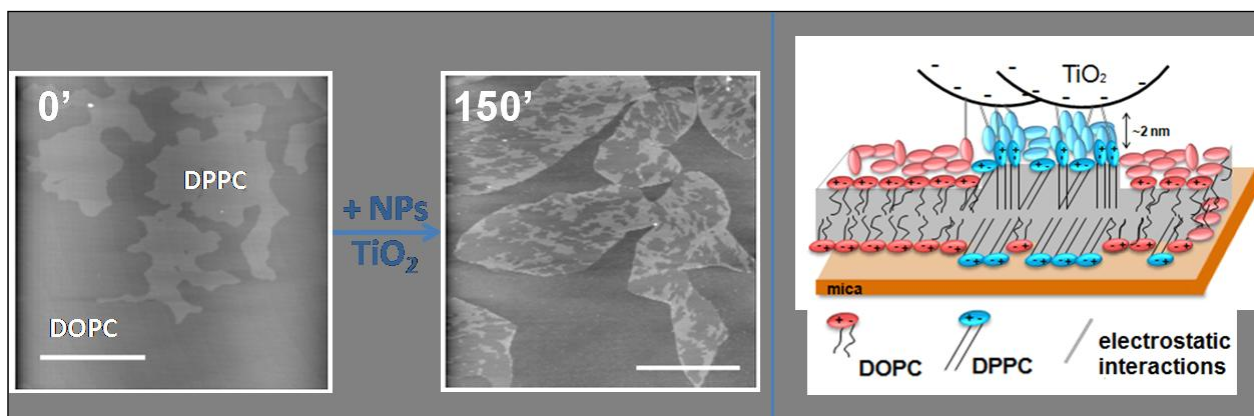
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par Estelle BEAUVAIS

Caractérisation de systèmes biologiques à l'échelle nanométrique : étude des interactions entre des modèles membranaires et des agents exogènes

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 15 octobre 2013
Spécialité : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

D2101

Thèse de doctorat présentée pour l'obtention du titre de Docteur de
l'Université de Technologie de Compiègne

Champ disciplinaire :
Bioingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

Présentée par

Estelle BEAUVAIS

**Caractérisation de systèmes biologiques à
l'échelle nanométrique :
Étude des interactions entre des modèles
membranaires et des agents exogènes.**

Soutenue le 15 octobre 2013,

Devant le jury composé de :

Pr. Véronique ROSILIO,	Rapporteur	(Univ. Paris-Sud)
Dr. Véronique VIÉ,	Rapporteur	(Univ. Rennes)
Pr. Ewa ROGALSKA,	Examinatrice	(Univ. Nancy 1)
Pr. Catherine MARQUE,	Examinatrice	(UTC)
Dr. Sandrine MORANDAT,	Directrice de thèse	(UTC)
Dr. Karim EL KIRAT,	Directeur de thèse	(UTC)

A mes deux-tiers, Eloïse et Grégory.

*« Je ne cherche pas à connaître les réponses, je
cherche à comprendre les questions »*

Confucius .

Remerciements

En premier lieu, je remercie mes co-directeurs de thèse : K. El Kirat et S. Morandat pour m'avoir encadré pendant ces 3 ans et d'avoir orienté mes travaux de recherche.

Les travaux de cette thèse, en co-direction, ont été effectués au sein du laboratoire de Bio-Mécanique et Bio-Ingénierie (BMBI) - UMR CNRS 7338), et du laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire (GEC) - FRE UTC CNRS 3580. Je tiens particulièrement à remercier les directeurs de chaque unité, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire pendant ces trois années de thèse. J'ai passé le plus clair de mon temps tout en bas, dans la pièce tout au fond au Service d'Analyses Physico-Chimique (SAPC). Je remercie donc très chaleureusement tous les membres de ce service, Sylvie, François (M. Blues Brothers) et Fred. Promis mes talons ne résonneront plus dans cet interminable couloir !

Je voudrais également adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail. Mesdames V. Rosilio et V. Vié qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse mais qui ont surtout contribué, par leurs nombreuses remarques et suggestions à l'amélioration de la qualité de ce mémoire. Je n'oublie pas leur aide précieuse dans la relecture (jusqu'à la dernière référence !) et la correction de ma thèse. Madame Ewa Rogalska m'a également fait l'honneur de participer au Jury de soutenance; je vous en remercie profondément.

Pour leurs encouragements et leur assistance morale qui m'ont permis de terminer cette thèse dans les meilleures conditions, je tiens à remercier particulièrement M-C Ho-Ba-Tho et C. Marque. Merci pour votre implication, votre engagement tout au long de cette thèse et de votre disponibilité de toute heure.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions scientifiques j'ai eu la chance d'avoir avec eux, que par le soutien moral, ou la présence bienveillante. Je pense ici en particulier à Slim Azouzi et Marie Besse (avec qui j'ai collaboré), Ophélie, Yannick, Abdel, Imène, Raouia, les deux Claire, Laetitia (ma co-Bride-to-be), Thierry, Jean, Marie N., Jérémy, Thibault, Timothée...

Je ne sais comment exprimer ma gratitude à Muriel Dufresne, Patrick Paullier, Christophe Egles et Muriel Vayssade (qui s'est beaucoup investie dans ma grande répétition !), pour leur écoute et leurs conseils bienveillants pour préparer mon avenir professionnel !

A ma sœur de cœur, ma collègue, mon amie, Amira, avec qui nous avons tout traversé pendant ces trois ans, côte à côte, se partageant l'AFM, notre outil (notre Ferrari) tantôt Saint-Graal tantôt maudit, les paillasses, le bureau immense (une chance pour un doctorant) MAIS PAS les micras ! Plus qu'une relation professionnelle, nous avons partagé des joies, des peines, des pleurs, et beaucoup de fous-rires...

REMERCIEMENTS

J'aimerais également exprimer toute ma gratitude à une personne que l'on ne retrouve pas souvent dans la partie des remerciements, mais qui est présente au quotidien et qui nous apporte son aide très précieuse tout au long de la thèse : Notre gestionnaire administrative et financière, Catherine Lacourt. Merci pour tout cet engagement envers les permanents, mais aussi envers les personnes « de passage », votre disponibilité, votre efficacité (malgré « la tonne » de tâches qui vous incombent), ainsi que votre bienveillance.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner TOUS mes relecteurs/correcteurs (et ils ont été nombreux, volontaires ou désignés d'office) : Odile (lecture envers), Doudou, Marie (lecture endroit), Margot (pour l'intro !), Patricia (même pour deux pages !), le GCU de Jard-sur-Mer (Archimède est bien représenté !).

Enfin, je ne saurais passer sous silence le soutien inestimable des membres de ma famille qui m'ont encouragé, de près ou de loin durant mes études doctorales. Merci à toi papa, d'avoir toujours été présent pour moi, c'est grâce à toi si j'en suis arrivée là aujourd'hui. Je témoigne également toute mon affection à ma fille, mon rayon de soleil, qui, haute comme trois pommes, m'a donné la force de me surpasser grâce à son innocence, ses mots d'enfants, sa gaieté contagieuse ! Enfin, les mots me manquent pour remercier, à sa juste valeur, mon conjoint, Grégory, pour son soutien inconditionnel, son épaule apaisante où je me suis, dans la dernière ligne droite de la thèse, souvent reposée. Merci d'avoir cru en moi, je te dois énormément et j'espère que ton « retour sur investissement » sera à la hauteur de tes espérances.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	18
INTRODUCTION	19
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	25
CHAPITRE I. LES MEMBRANES BIOLOGIQUES	27
<i>I.1. Rôle structural et fonctionnel des membranes biologiques</i>	27
<i>I.2. Composition des membranes</i>	28
I.2.1. Les glycérophospholipides	28
I.2.2. Les sphingolipides	29
I.2.3. Le cholestérol	30
<i>I.3. Etats physiques des membranes</i>	31
<i>I.4. Organisation des lipides dans la membrane</i>	34
I.4.1. Asymétrie membranaire.....	34
I.4.2. Orientation des phospholipides dans la membrane	34
<i>I.5. Les rafts lipidiques</i>	35
I.5.1. Intervention du cholestérol dans la formation des domaines	36
I.5.2. Propriétés et rôle des rafts biologiques	36
CHAPITRE II. LES MODELES MEMBRANAIRES BIOMIMETIQUES	40
<i>II.1. Les monocouches lipidiques</i>	40
II.1.1. Bref historique.....	40
II.1.2. Principe de formation d'une monocouche.....	40
II.1.3. Mesure de la pression de surface	41
II.1.4. Les isothermes de compression	42
II.1.5. Propriétés thermodynamiques	43
<i>II.2. Les vésicules lipidiques</i>	45
<i>II.3. Les bicouches lipidiques supportées</i>	46
<i>II.4. Pertinence et limitation des modèles membranaires</i>	50
CHAPITRE III. LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE	52
<i>III.1. Historique</i>	52
<i>III.2. Principe physique de l'AFM</i>	53
<i>III.3. Les différents modes d'imagerie</i>	56
III.3.1. Mode contact.....	56

III.3.2. Mode contact intermittent (Tapping Mode™)	56
III.3.3. Mode non-contact	57
III.4. <i>La spectroscopie de force</i>	57
III.4.1. Mesure des propriétés mécaniques d'objets biologiques.....	58
III.4.2. Mesure des interactions intermoléculaires	59
III.4.3. Etirement de macromolécules biologiques.....	62
III.5. <i>Avancées technologiques, couplages et nouveaux modes</i>	64
III.5.1. Couplage imagerie/spectroscopie de force	64
III.5.2. Couplage AFM/microscopie optique	64
III.5.3. Le « High Speed » AFM	66
III.5.4. Variantes de l'AFM	67
CHAPITRE IV. ETUDE DES MEMBRANES BIOMIMETIQUES PAR AFM	68
IV.1. <i>Etude de l'organisation des bicouches lipidiques supportées</i>	68
IV.1.1. Organisation latérale et ségrégation de phase	68
IV.1.2. Mécanisme de nucléation et croissance des domaines	69
IV.1.3. Modalités de fusion.....	70
IV.1.4. Organisation des rafts lipidiques dans les membranes	71
IV.2. <i>Interaction des membranes biomimétiques avec des agents exogènes</i>	71
IV.2.1. Interaction avec des peptides	71
IV.2.2. Interaction avec des protéines.....	73
IV.2.3. Interaction avec des médicaments.....	73
IV.2.4. Interaction avec des nanoparticules	74
IV.3. <i>Evaluation des propriétés nanomécaniques des membranes</i>	76
IV.3.1. Caractérisation mécanique des SLBs	76
IV.3.2. Modification des propriétés mécaniques des SLBs par des agents exogènes.....	80
CHAPITRE V. AGENTS EXOGENES CHOISIS DANS CE TRAVAIL.....	82
V.1. <i>Implication des membranes dans certaines maladies : le cas du paludisme</i>	82
V.1.1. Cycle de développement du parasite.....	83
V.1.2. Implication des structures membranaires dans le cycle de développement du parasite.....	85
V.1.3. Intervention de l'hématine et de ses dérivés dans le processus de détoxification.....	87
V.2. <i>Rôle des membranes biologiques dans les études toxicologiques liées à l'émergence des nanotechnologies</i>	91
V.2.1. Les nanoparticules: produits issus des nanotechnologies ?	92
V.2.2. Exposition aux nanoparticules : un risque pour la santé ?.....	96
V.2.3. Les NPs de TiO ₂	99
MATERIELS & METHODES	103
CHAPITRE I. PREPARATION DES MODELES MEMBRANAIRES	105
I.1. <i>Les lipides utilisés</i>	105
I.2. <i>Les monocouches de Langmuir</i>	106
I.3. <i>Les liposomes</i>	106
I.3.1. Obtention de SUVs par sonication.....	106
I.3.2. Obtention de LUVs par extrusion	107

1.4. Les bicouches lipidiques supportées (SLBs)	107
CHAPITRE II. METHODES BIOPHYSIQUES DE CARACTERISATION DES MODELES MEMBRANAIRES.....	108
II.1. Tensiométrie de surface.....	108
II.1.1. Isothermes de compression.....	108
II.1.2. Adsorption des molécules à aire constante.....	109
II.2. Spectroscopie de fluorescence	110
II.2.1. Etude de la perméabilité membranaire	110
II.2.2. Etude de la fluidité des membranes	112
II.3. AFM.....	113
II.3.1. Observations de l'effet de différents paramètres sur la topographie des SLBs.....	114
II.3.2. Suivi en temps réel de l'interaction de l'hématine avec des SLBs	114
II.3.3. Visualisation de l'effet des NPs de TiO ₂ sur les SLBs biomimétiques.....	115
CHAPITRE III. PREPARATION DE L'HEMATINE ET FORMATION DE LA B-HEMATINE	116
III.1. Préparation de l'hématine et de la CQ.....	116
III.2. Dosage de l'hématine.....	116
CHAPITRE IV. CARACTERISATION DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE.....	118
IV.1. Choix des nanoparticules de TiO ₂	118
IV.2. Caractérisation physico-chimique des NPs de TiO ₂	119
IV.2.1. Mesure de taille en solution par diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	119
IV.2.2. Mesure des taille par microscopie électronique à balayage (MEB)	120
RESULTATS.....	123
CHAPITRE I. MODULATION DE LA STRUCTURE DES MEMBRANES.....	125
I.1. Influence de la température de fusion.....	125
I.2. Influence du pourcentage lipides saturés/lipides insaturés.....	138
I.3. Conclusions.....	141
CHAPITRE II. IMPLICATION DES MEMBRANES LIPIDIQUES DANS LA CRISTALLISATION DE L'HEMATINE	144
II.1. Propriétés membranotropes de l'hématine.....	144
II.2. Modalités de polymérisation de l'hématine en β-hématine	149
II.2.1. Cinétique de polymérisation de l'hématine	149
II.2.2. Mesures des propriétés interfaciales de l'hématine en cours de polymérisation.....	150
II.2.3. Influence des lipides sur la cinétique de polymérisation	151
II.3. Interaction de l'hématine et de ses dérivés avec des modèles membranaires supportés.....	154
II.3.1. Conditions favorisant les formes monomériques (pH neutre)	154
II.3.2. Conditions favorisant les formes dimériques (pH acide).....	162
II.3.3. Conditions établissant un équilibre monomères/dimères (pH acide puis neutre)	164
II.4. Effet d'un antipaludéen, la chloroquine, sur l'interaction entre l'hématine et les bicouches lipidiques	171
II.5. Conclusions	173
CHAPITRE III. INTERACTION DES NPs DE TiO ₂ AVEC DES MODELES MEMBRANAIRES BIOMIMETIQUES	176
III.1. Interaction des NPs de TiO ₂ avec des modèles lipidiques du surfactant pulmonaire.....	176
III.1.1. Organisation des NPs en présence de vésicules lipidiques.....	177

TABLE DES MATIERES

III.1.2. Influence des NPs de TiO ₂ sur l'intégrité membranaire	180
III.1.3. Visualisation des changements morphologiques de bicouches lipidiques après exposition aux NPs.....	185
<i>III.2. Interaction des NPs de TiO₂ avec des modèles lipidiques des membranes cellulaires.....</i>	<i>192</i>
III.2.1. Adsorption des liposomes à la surface des NPs de TiO ₂	192
III.2.2. Influence des NPs de TiO ₂ sur l'intégrité membranaire	193
III.2.3. Visualisation des changements morphologiques de bicouches lipidiques après exposition aux NPs.....	198
<i>III.3. Conclusions</i>	<i>206</i>
DISCUSSION	209
CHAPITRE I. CONTROLE DE LA STRUCTURE MEMBRANAIRE ET CREATION DE MEMBRANES A FAÇON.....	211
CHAPITRE II. ROLE DES MEMBRANES LIPIDIQUES DANS LA DETOXIFICATION DE L'HEMATINE : PROPOSITION D'UN MECANISME D'ACTION.....	214
CHAPITRE III. PERTURBATION DE L'INTEGRITE MEMBRANAIRE SOUS L'EFFET DE NPS : PROPOSITION D'UN MECANISME D'ACTION.....	220
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	227
REFERENCES.....	233
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES	261

Liste des abréviations

AFM : Microscop(i)e à force atomique (*Atomic Force Microscopy*)

AMP : Peptide antimicrobien (*AntiMicrobial Peptide*)

BAM : Microscop(i)e à angle de Brewster (*Brewster Angle Microscope*)

Chol : Cholestérol

CQ : Chloroquine

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*)

DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

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

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DSPC : 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

FM : Microscop(i)e de fluorescence

GP : Polarisation généralisée (*Generalized polarization*)

GUV : Liposome unilamellaire géant (*Giant Unilamellar Vesicle*)

HS-AFM : *High-Speed AFM*

Hb : Hémoglobine

Hz : Hémozoïne

LB : Langmuir-Blodgett

LC : Liquide condensé

LE : Liquide expansé

LS : Langmuir-Schaeffer

LUV : Liposome unilamellaire de grande taille (*Large Unilamellar Vesicle*)

NP : Nanoparticule

MEB : Microscop(i)e Electronique à Balayage

MLV : Liposome multilamellaire (*Multilamellar Vesicle*)

LISTE DES ABREVIATIONS

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

PEG : Poly(éthylèneglycol)

PIM : Pression d'Insertion Maximale

POPC : 1-oléoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

RTV : Réseau Tubulo-Vésiculaire

TBS : Tampon Tris (*Tris Buffer Solution*)

T_m : Température de transition de phase (*melting temperature*)

TX-100 : Triton X-100

SLB : Bicouche lipidique supportée (*Supported Lipid Bilayer*)

SM : Sphingomyéline

STM : Microscope à effet tunnel (*Scanning Tunneling Microscope*)

SUV : Liposome unilamellaire de petite taille (*Small Unilamellar Vesicle*)

VP : Vacuole Parasitophore

VD : Vacuole Digestive

Liste des figures

Figure 1. Modèle de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson en 1972.....	27
Figure 2. Structure des glycérophospholipides	29
Figure 3. Structure des sphingomyélines	29
Figure 4. Schématisation des différents états physiques d'une bicouche lipidique et les paramètres impliqués.....	32
Figure 5. Images AFM d'une bicouche de DPPC montrant différentes phases « ripples ».....	33
Figure 6. Organisation des chaînes aliphatiques des lipides au sein d'un domaine membranaire.....	35
Figure 7. Formation des plateformes lipidiques et implication des rafts dans les processus de bourgeonnement.	38
Figure 8. Principe de formation d'une monocouche par la technique de Langmuir	41
Figure 9. Principe de mesure par la balance de Wilhelmy.....	41
Figure 10. Isotherme de compression théorique	43
Figure 11. Structure de différents liposomes	45
Figure 12. Formation d'une SLB visualisée par High Speed AFM en temps réel	49
Figure 13. Forces d'interactions entre la pointe et la surface de l'échantillon.....	53
Figure 14. Principe de l'AFM (A) et images de microleviers (B et C).....	54
Figure 15. Mesure de la largeur réelle de l'objet biologique imagé.....	55
Figure 16. Principe de la spectroscopie de force.....	58
Figure 17. Mesure des différences d'élasticité de la paroi d'une levure sauvage et mutée	59
Figure 18. Mesure d'interactions intermoléculaires spécifiques de type ligand/récepteur	61
Figure 19. Dépliement d'une protéine membranaire par spectroscopie de force.....	63
Figure 20. Combinaison AFM/FM pour l'étude de l'interaction SRB1/Anti-SRB1	65
Figure 21. Visualisation par HS-AFM du déplacement d'une tête de myosine sur un filament d'actine.	66
Figure 22. Formation des SLBs sur des surfaces nanostructurées ;	70
Figure 23. Interaction de la gramicidine A (gA) avec une SLB de DPPC.....	72
Figure 24. Interaction de dendrimères de plusieurs générations avec une SLB	76
Figure 25. Représentation d'une courbe d'indentation d'une SLB.....	78
Figure 26. Evaluation de la résistance mécanique de bicouches lipidiques.....	79

Figure 27. Mesure des forces nécessaires pour fusionner deux bicouches flottantes de PC en présence de SNAREs.	81
Figure 28. Cycle de développement du parasite du genre <i>Plasmodium</i> chez l'Homme (A et B) et chez l'anophèle (C)	83
Figure 29. Schéma d'un érythrocyte infecté par le parasite <i>Plasmodium falciparum</i>	85
Figure 30. Changements morphologiques de la membrane érythrocytaire après infection par le parasite <i>Plasmodium</i>	86
Figure 31. Différentes formes de l'hématine en solution et les différentes voies associées de conversion de l'hématine monomérique en hémazoïne.	88
Figure 32. Mécanisme de formation de l'hémazoïne proposé par Hempelmann	90
Figure 33. Diversité des NPs d'origine naturelle ou produits issus de l'ingénierie	92
Figure 34. Interaction des NPs avec des membranes lipidiques modèles.	99
Figure 35. Schéma de la forme cristalline d'anatase	100
Figure 36. Quantité de NPs de TiO ₂ dans les produits cosmétiques (A) et agroalimentaires (B)	101
Figure 37. Structure des lipides utilisés dans ce travail.	105
Figure 38. Principe de la technique de Langmuir utilisée pour évaluer la capacité de pénétration d'une molécule dans une monocouche lipidique	109
Figure 39. Localisation des sondes Laurdan et Prodan dans un feuillet lipidique.	113
Figure 40. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) préparées à différentes températures de fusion.	127
Figure 41. Histogrammes des distributions d'aires et de périmètres des domaines de DPPC.	128
Figure 42. Influence de la température de fusion sur la taille des domaines de DPPC.	130
Figure 43. Suivi dans le temps de la taille des domaines de DPPC d'une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire)	131
Figure 44. Evolution de la taille des domaines de DPPC en fonction du temps.	132
Figure 45. Images AFM d'une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 fusionnée à 21°C puis chauffée à 60°C	133
Figure 46. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) obtenues après un refroidissement brutal.	134
Figure 47. Images AFM de bicouches de DOPC/DSPC 1:1 (ratio molaire) préparées à différentes températures de fusion.	136

Figure 48. Influence de la température de fusion sur la taille des domaines de DSPC.....	137
Figure 49. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC préparées à différents ratios molaires	138
Figure 50. Influence du taux de DPPC sur le recouvrement.....	139
Figure 51. Influence du taux de DPPC sur la ligne de tension phase gel/fluide	140
Figure 52. Isothermes de compression de l'hématine et de la POPC.....	145
Figure 53. Cinétiques de remontée de l'hématine sous des monocouches de POPC à différentes pressions initiales	147
Figure 54. Insertion de l'hématine dans les monocouches de POPC.....	148
Figure 55. Cinétique de polymérisation de l'hématine en β -hématine	149
Figure 56. Influence de la polymérisation de l'hématine sur son insertion dans les monocouches de POPC	150
Figure 57. Influence de la présence de lipides sur la cinétique de polymérisation	152
Figure 58. Influence de la nature des lipides sur la cinétique de polymérisation	153
Figure 59. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à 8 μ M avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	155
Figure 60. Grossissement de l'épaississement observé au niveau des bords des domaines ..	156
Figure 61. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à 10 μ M avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	157
Figure 62. Grossissement des structures observées après injection de l'hématine à 10 μ M..	159
Figure 63. Suivi AFM après injection d'une solution de contrôle sur une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	160
Figure 64. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à 20 μ M avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	161
Figure 65. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à pH 5,2 avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	163
Figure 66. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine, incubée à pH 5,2 puis ramenée à pH neutre, avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	165
Figure 67. Grossissements des structures observées après injection de l'hématine à 10 μ M	167
Figure 68. Evolution de la taille des structures fibreuses dans le temps	168
Figure 69. Evaluation de la croissance moyenne des structures fibreuses.....	169
Figure 70. Intervention de la Chloroquine (CQ) dans l'équilibre entre monomères et dimères d'hématine	171

Figure 71. Inhibition de la formation de la β -hématine en présence de la CQ.....	172
Figure 72. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine + CQ avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	172
Figure 73. Visualisation par MEB des NPs d'anatase en absence ou en présence de SUVs de DPPC.....	178
Figure 74. Adsorption des liposomes sur les NPs de TiO_2 après centrifugation	180
Figure 75. Mesure de la perméabilité membranaire en présence de NPs de TiO_2	181
Figure 76. Mesure de la variation du GP des sondes Laurdan et Prodan sous l'influence des NPs de TiO_2	183
Figure 77. Variation de l'ordre membranaire à 35°C induite par la présence de NPs de TiO_2 à 200 $\mu\text{g/mL}$	184
Figure 78. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO_2 à 21°C.	186
Figure 79. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 3:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 1 heure avec des NPs de TiO_2 à 21°C.....	187
Figure 80. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) après incubation avec des NPs de TiO_2 pendant 2h30 min à 21°C.	188
Figure 81. Grossissements de l'épaississement observé sur de domaine de DPPC après incubation avec des NPS de TiO_2 à 200 $\mu\text{g/mL}$ pendant 2h30.	189
Figure 82. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) après incubation avec des NPs de TiO_2 pendant 30 min à 37°C puis 2 heures à 21°C.....	190
Figure 83. Adsorption des liposomes sur les NPs de TiO_2 après centrifugation	192
Figure 84. Mesure de la perméabilité membranaire en présence de NPs de TiO_2	194
Figure 85. Mesure de la variation du GP des sondes Laurdan et Prodan sous l'influence des NPs de TiO_2	195
Figure 86. Variation de l'ordre membranaire à 35°C induite par la présence de NPs de TiO_2 à 200 $\mu\text{g/mL}$	197
Figure 87. Images AFM de bicouches de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO_2 à 21°C.	199
Figure 88. Grossissement de l'épaississement observé sur de domaine de SM après incubation avec des NPS de TiO_2 à 10 $\mu\text{g/mL}$ pendant 30 min.....	200
Figure 89. Images AFM de bicouches de DOPC/SM/Chol 4:3:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO_2 à 21°C.	203

Figure 90. Images AFM de bicouches de DOPC/SM/Chol 2:1:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO ₂ à 21°C.	204
Figure 91. Grossissements d'un domaine en phase Lo après incubation avec des NPS de TiO ₂ à 1 µg/mL pendant 30 min.	205
Figure 92. Interprétation proposée des suivis AFM réalisés après injection de l'hématine (à différents pH) sur des SLBs de DOPC/DPPC.....	216
Figure 93. Mécanisme proposé de la formation de fibres d'hématine dans les vésicules cytosomales conduisant à la formation d'hémozoïne dans la VD.....	218
Figure 94. Mécanisme d'interaction proposé entre les NPs de TiO ₂ et les membranes de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).....	222
Figure 95. Mécanisme d'interaction proposé entre les NPs de TiO ₂ et les membranes de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire).....	223
Figure 96. Mécanisme d'interaction proposé entre les NPs de TiO ₂ et les membranes de DOPC/SM/Chol	225

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition lipidique de différentes membranes :.....	30
Tableau 2. Méthodes usuelles pour préparer des SLBs : Avantages et inconvénients	47
Tableau 3. Différents types de support utilisés pour former des SLBs : avantages et inconvénients.....	50
Tableau 4. Caractéristiques des NPs influant sur leurs propriétés :.....	93
Tableau 5. Diversité des domaines d'applications et des propriétés exploitées par type de nanoparticules :	95
Tableau 6. Conditions de préparation des SLBs de différentes compositions lipidiques :	107
Tableau 7. Récapitulatif des différentes structures observées à différents pH.....	170
Tableau 8. Comparaison des diamètres des NPs d'anatase mesurés par DLS et à partir des images MEB.....	179

Introduction

Les membranes biologiques jouent un rôle essentiel en tant que barrière biologique, mais paradoxalement, elles constituent une plateforme d'échanges où ont lieu les phénomènes de reconnaissance moléculaire, de catalyse enzymatique, ou encore de fusion membranaire. Les lipides, constituant majeur des membranes biologiques, ne sont généralement pas considérés comme des molécules ayant une tâche spécifique dans ces systèmes mais plutôt comme des éléments structuraux, à l'instar des protéines. Cependant, ces molécules fascinantes sont capables de s'auto-assembler en milieu liquide par des liaisons moléculaires et supramoléculaires, ou encore, de former un réseau complexe dynamique. Depuis le modèle très célèbre de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson en 1972 (Singer & Nicholson, 1972), la curiosité des chercheurs pour les membranes biologiques n'a eu de cesse d'augmenter. Avec la « découverte » de l'existence d'entités lipidiques distinctes, aux caractéristiques structurelles particulières, appelées *rafts* (Simons & Ikonen, 1997), cet intérêt s'est particulièrement accentué à partir de la fin des années 90'. En effet, le potentiel rôle fonctionnel des phospholipides, au sein des membranes biologiques, a dès lors été pris en compte lors d'études toxicologiques, pharmacologiques... Parallèlement, l'émergence de nouvelles technologies a permis le développement de divers outils, permettant de mieux comprendre ces systèmes biologiques extrêmement complexes.

Ainsi, en raison de cette complexité, beaucoup d'études ciblant les mécanismes biologiques qui se déroulent à la surface des membranes, ont utilisé, dans un premier temps, des modèles membranaires biomimétiques. Ces modèles, développés durant le dernier siècle, ont donc été établis afin d'étudier les propriétés membranaires, tant structurelles que fonctionnelles. Les systèmes biomimétiques les plus connus et les plus communément utilisés sont : les monocouches, les liposomes, et les bicouches lipidiques supportées (*Supported Lipid Bilayers* en anglais, SLBs). Chacun d'entre eux comporte avantages et inconvénients, mais tous miment au moins l'arrangement lipidique des membranes cellulaires naturelles.

La diversification des techniques d'analyses, comme la RMN¹, la spectrométrie de masse, la fluorescence ou encore la diffraction des rayons X, ont permis d'avancer considérablement dans les domaines d'études des systèmes biologiques.

Cependant, l'arrivée de la microscopie à force atomique (AFM) a révolutionné le domaine des sciences biologiques en permettant pour la première fois d'opérer en milieu liquide sur une grande variété d'échantillons biologiques (Hinterdorfer & Dufrêne, 2006; Oesterhelt & Scheuring, 2006; Radmacher et al, 1992). Pour l'étude de modèles membranaires, la force de cet outil réside dans le fait de visualiser la structure de ces systèmes lipidiques en temps réel et avec une résolution sans précédent de l'ordre du nanomètre. Ainsi, depuis ces 15 dernières années, beaucoup de travaux se sont concentrés sur l'étude de l'organisation des systèmes lipidiques supportés, à l'échelle nanométrique (Richter et al, 2006). Parallèlement, d'autres travaux se sont dirigés vers l'étude des interactions entre ces modèles et des composés (naturels ou synthétiques) très diversifiés comme, des peptides, des protéines, des médicaments, ou encore plus récemment, des nanoparticules (El Kirat et al, 2010).

C'est dans ce contexte, en perpétuel développement, que s'inscrit notre étude. Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à étudier l'influence de certains paramètres sur l'organisation (taille, ségrégation de phase), et des propriétés qui en découlent, des SLBs. Ce travail nous permettra alors, de disposer de modèles lipidiques supportés, présentant des caractéristiques différentes. Par la suite, ceux-ci seront exploités pour appréhender l'interaction potentielle des membranes modèles avec divers agents exogènes.

Dans une deuxième partie, nous avons donc étudié le comportement de deux agents exogènes au contact de modèles membranaires lipidiques, grâce à une approche multitechnique incluant divers outils biophysiques (spectroscopie de fluorescence, tensiométrie de surface et AFM). Les deux agents exogènes considérés sont différents en termes de nature et tous deux sont impliqués dans des contextes bien distincts. Néanmoins, ils ont un point commun majeur : leur interaction avec les membranes biologiques. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de deux agents exogènes, en collaboration avec d'autres doctorants de l'équipe.

¹ RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Le premier agent exogène que nous avons étudié est une molécule impliquée dans le cycle de développement du parasite responsable du paludisme. Bien que cette maladie infectieuse soit étudiée depuis plusieurs siècles, les mécanismes moléculaires intervenant à certains stades de ce cycle demeurent, encore aujourd'hui, sujets à débat. Plusieurs études ont notamment suggéré l'implication des membranes lipidiques du parasite dans ces étapes. L'élucidation complète du cycle de développement de ce parasite infectieux est donc devenue cruciale pour le développement de nouvelles molécules antipaludiques. Dans ce contexte, nous nous sommes donc proposés d'étudier le comportement de cette molécule au sein de membranes lipidiques modèles.

Le second agent exogène étudié, lui, fait l'objet d'une toute autre controverse. Composé issu de l'émergence des nanotechnologies, il est retrouvé dans de nombreux produits de consommation dans les secteurs cosmétiques et alimentaires entre autres. Parallèlement, du fait de son utilisation récente, les données concernant sa toxicité, sa dispersion (dans notre organisme et/ou dans l'environnement), ainsi que son élimination sont relativement peu renseignées. Dans ce contexte suscitant encore beaucoup d'interrogations, nous nous sommes intéressés à l'effet de cet agent exogène au contact de membranes modèles, mimant l'interaction potentielle avec les membranes biologiques.

Ainsi, grâce à la haute résolution de l'AFM, le comportement de ces deux agents exogènes, au sein de modèles membranaires, a pu être visualisé. Puis, à l'aide de ces observations ainsi que des autres résultats complémentaires, nous avons pu proposer un mécanisme d'interaction entre ces composés et les membranes biologiques. Enfin, ces mécanismes contribueront à répondre à des questions d'intérêt scientifiques.

Contexte Bibliographique

Chapitre I. Les membranes biologiques

I.1. Rôle structural et fonctionnel des membranes biologiques

Les membranes biologiques ont aussi bien un rôle de compartimentation, délimitant les organites intracellulaires et la cellule elle-même, qu'un rôle fonctionnel. En effet, en plus de leur perméabilité sélective, elles constituent, entre autres, le siège des phénomènes de transduction du signal ou encore du maintien de l'homéostasie. L'analyse des propriétés tant structurelles que fonctionnelles a permis d'établir un modèle de base admis par tous mais depuis un certain temps controversé.

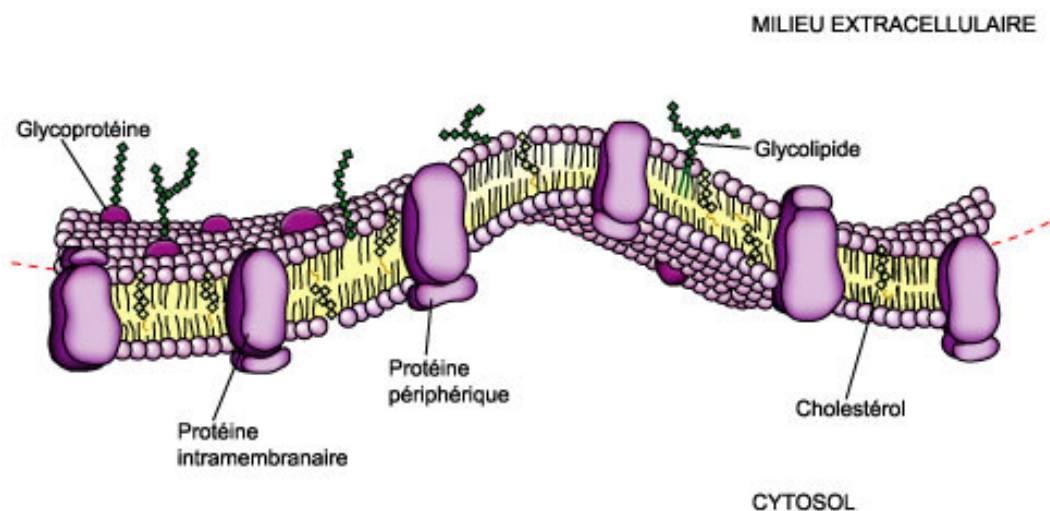


Figure 1. Modèle de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson en 1972.

Ce modèle a, pour la première fois, regroupé des résultats expérimentaux pertinents comme la mobilité transversale limitée des lipides, la diffusion latérale des molécules dans la membrane, l'organisation des protéines dans la membrane selon leur nature. Toutes ces expérimentations et les hypothèses qui en ont découlées ont été reprises dans l'ouvrage de M. Luckey (Luckey, 2008).

En effet, devant l'émergence de nouvelles techniques de pointe (diffractométrie des rayons X, spectrométrie de masse, RMN, techniques biophysiques diverses), les détails structuraux des membranes biologiques se sont précisés. Ainsi, ils ont pu mettre en lumière le rôle fonctionnel des lipides dans divers processus membranaires. Par conséquent, le schéma simplifié de la « mosaïque fluide » (Figure 1) s'est complexifié, le rendant avec le temps obsolète.

Aujourd'hui, il est admis que les lipides membranaires jouent un rôle déterminant dans les phénomènes de transduction du signal par exemple, constituant ainsi une véritable structure dynamique à l'instar des protéines. Le rôle fonctionnel des lipides a pu, en grande partie, être mis en évidence grâce à l'utilisation de systèmes membranaires modèles, que nous développerons plus tard.

I.2. Composition des membranes

Les membranes biologiques sont des structures extrêmement complexes aussi bien en termes de composition (lipidique et protéique) (Tableau 1) qu'en termes d'organisation. Les lipides et les protéines transmembranaires (Figure 1), composant les membranes biologiques, sont des molécules amphiphiles. Cette propriété particulière donne lieu à un auto-assemblage des molécules en bicouches (visionnées pour la première fois en 1959, par J.D. Robertson). Les parties hydrophobes se retrouvent au cœur de la membrane, orientant les régions hydrophiles vers l'extérieur, en contact direct avec le milieu aqueux. Cet édifice est consolidé par des liaisons ioniques, hydrogènes, de van der Waals ou encore par des interactions hydrophobes. Les lipides membranaires sont généralement classés dans trois groupes : les phospholipides (englobant les glycérophospholipides et les sphingolipides), les glycolipides et les stérols.

I.2.1. Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides constituent plus de 50 % des lipides membranaires (Tableau 1). Ils sont composés d'un squelette de glycérol, sur lequel deux chaînes d'acides gras sont estérifiées en position *sn*-1 et *sn*-2 respectivement. Ces acides gras, constituant la queue hydrophobe, sont fréquemment à longue chaîne (supérieure à 16 carbones) et peuvent être saturés ou insaturés (Figure 2). Une deuxième partie, appelée « tête polaire », vient se greffer au troisième atome de carbone (*sn*-3) de la molécule de glycérol. Celle-ci est constituée d'un groupement phosphate qui est estérifié, soit par un alcool aminé (sérine, éthanolamine ou choline), soit par un polyol non azoté (inositol ou glycérol) (Figure 2).

La grande diversité aussi bien d'acides gras dans les chaînes aliphatiques (nombres de carbone, nombre et position des insaturations), que de têtes polaires (Figure 2) dénote bien toute la complexité des membranes biologiques. Néanmoins, le phosphatidylcholine (PC)

reste le phospholipide le plus présent dans les membranes, représentant plus de 50 % (molaire) des lipides membranaires (van Meer, 2005) (Tableau 1).

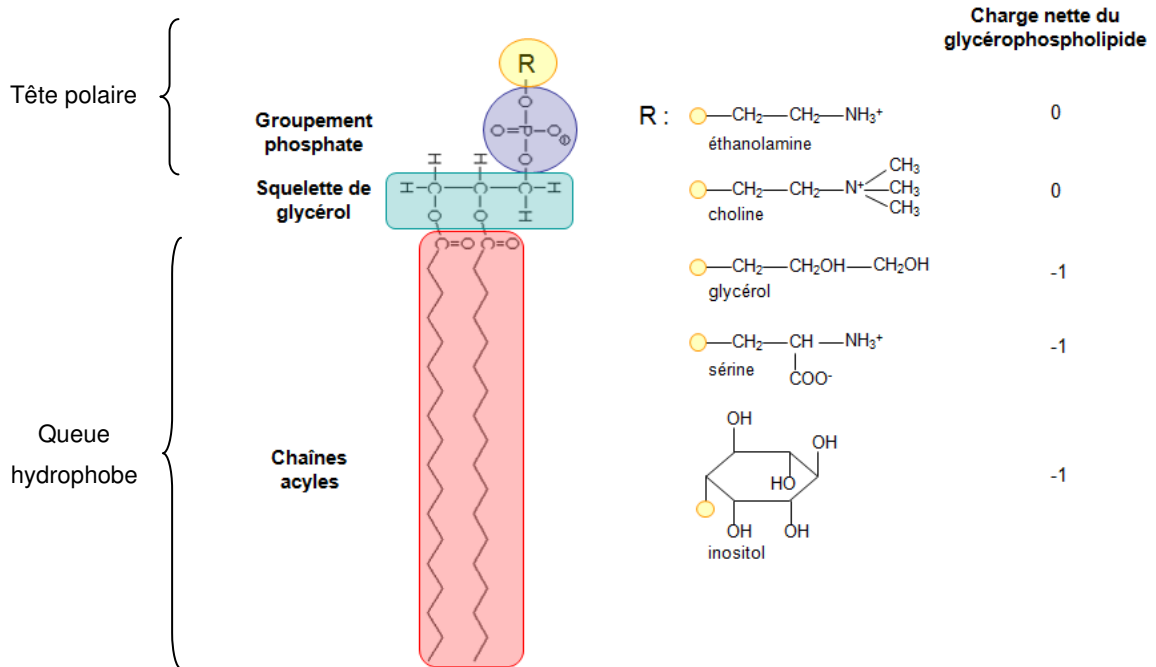


Figure 2. Structure des glycérophospholipides

Adaptée de Schechter E., « biochimie et biophysique des membranes », 2nd édition, Masson, 1997

I.2.2. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont une autre classe importante des phospholipides et sont impliqués notamment dans la formation de microdomaines (cf. I.5. Les rafts lipidiques), au sein des membranes biologiques.

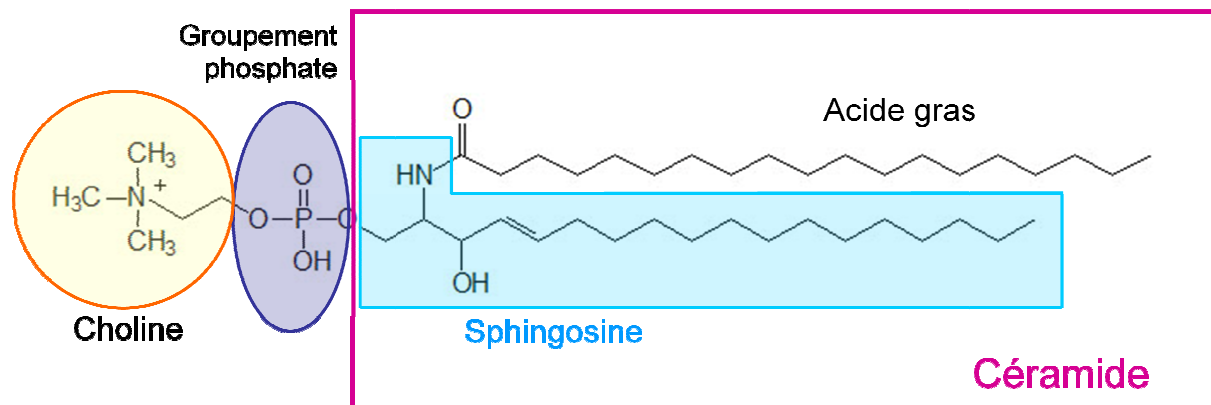


Figure 3. Structure des sphingomyélines

Le constituant de base des sphingolipides est la céramide, qui résulte de l'amidification du squelette de sphingosine par un acide gras (Figure 3). Ce dernier est très fréquemment saturé et à longue chaîne. On distingue les sphingophospholipides qui dérivent de la céramide par l'addition sur la fonction alcool d'un groupement phosphate, des sphingoglycolipides (liaison d'un sucre simple ou d'un oligosaccharide sur la fonction alcool). La sphingomyéline (SM), dont le groupement polaire est constitué d'une phosphocholine (Figure 3), est le sphingophospholipide le plus abondant dans les membranes cellulaires des mammifères. Elle doit son nom à sa première mise en évidence dans la gaine des axones myélinisés.

Tableau 1. Composition lipidique de différentes membranes :

	Myéline	Erythrocyte	Mitochondrie	<i>E. coli</i>	Chloroplaste
Lipide/Protéine (en poids)	3:1	1:3	1:3	1:3	1:1
Glycérophospholipides	32	56	95	100	12
dont					
PC	11	23	48		
PE	14	20	28	80	
PI		2	8		
PS	7	11			
PG				15	12
DPG			11	5	
Sphingolipides	40	18			
Stérol	25	25	5		

PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine, PG : phosphatidylglycérol, DPG : diphosphatidylglycérol. La composition est donnée en pourcentage massique de la quantité totale de lipides.

D'après Schechter E., « biochimie et biophysique des membranes », 2nd édition, Masson, 1997

I.2.3. Le cholestérol

Le cholestérol (Chol) fait partie de la famille des stéroïdes regroupant, entre autres, des hormones stéroïdiennes, les sels biliaires et les vitamines D. Unique stérol des membranes cellulaires de mammifères, le Chol est aussi une molécule amphiphile. En effet, il possède une petite partie polaire, le groupement hydroxyle (OH), et une partie apolaire, composée des noyaux stéroïdes et de la chaîne hydrocarbonée. Dans les membranes biologiques, le cholestérol est orienté parallèlement aux chaînes des acides gras des phospholipides. Le

groupement OH, lui, interagit avec les têtes polaires des phospholipides environnants, en établissant des liaisons faibles.

I.3. Etats physiques des membranes

Les membranes biologiques sont des structures dynamiques. En effet, les molécules phospholipidiques qui les composent, sont animées de divers mouvements. On distingue les mouvements intramoléculaires (mouvements d'isomérisation *trans*-gauche des chaînes hydrocarbonées et de rotation des liaisons carbone/carbone), des mouvements intermoléculaires au sein de la membrane. Parmi ces derniers, on discerne la diffusion rotationnelle, la diffusion latérale et la diffusion transversale (flip-flop) qui est un mouvement extrêmement lent.

En milieu aqueux, les membranes lipidiques peuvent exister dans différents états de phase, gouvernés par l'organisation latérale, l'ordre moléculaire, et la mobilité des lipides membranaires. Ceux-ci sont dépendants de paramètres physico-chimiques comme la température, le pH, la force ionique, la nature des lipides et notamment de la présence de cholestérol. La membrane peut osciller entre deux états extrêmes : la phase gel et la phase fluide. Lorsque les lipides sont en phase gel (L_{β} ou $L_{\beta'}$), aussi appelée phase solide-ordonnée (S_0), les mouvements intramoléculaires et intermoléculaires sont réduits, et les interactions hydrophobes sont favorisées. Par conséquent, les lipides membranaires sont peu mobiles (Figure 4). A l'inverse la phase fluide (L_{α}), également appelée phase liquide-désordonnée (L_d), est caractérisée par un accroissement des mouvements intramoléculaires, et d'une augmentation de la diffusion rotationnelle et latérale, induisant ainsi une grande mobilité des lipides au sein de la membrane. La transition entre ces deux états se produit à une certaine température appelée température de transition de phase (*melting temperature* en anglais, T_m). Cette T_m est un paramètre intrinsèque au lipide et peut être déterminée par diverses techniques (calorimétrie, fluorescence, diffraction des rayons X). La T_m dépend notamment de la longueur des chaînes alkyles ainsi que leur degré d'insaturation. Ainsi, cette valeur sera d'autant plus grande que les chaînes aliphatiques sont longues et le nombre d'insaturation est faible voire nul.

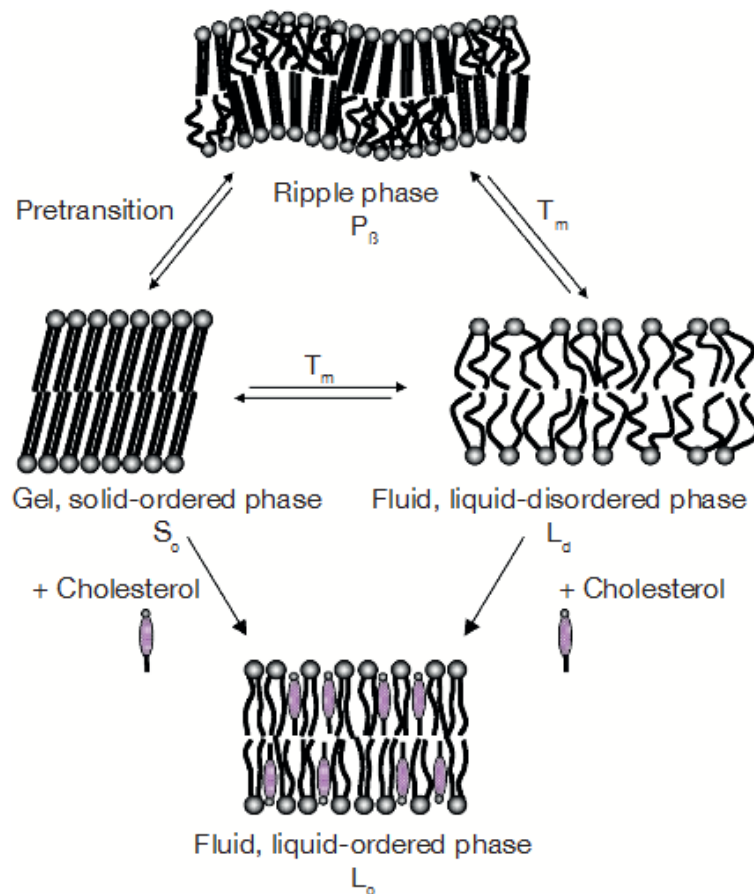


Figure 4. Schématisation des différents états physiques d'une bicouche lipidique et les paramètres impliqués.

L'état physique d'une membrane est caractérisé par l'organisation latérale, l'ordre moléculaire ainsi que la mobilité des molécules lipidiques la composant. Les deux états extrêmes sont la phase gel (à gauche) et fluide (à droite). Dans la phase gel (L_{β}), encore appelée phase solide-ordonnée (S_o), les lipides sont extrêmement compactés (isomérisation *all-trans*) et par conséquent très peu mobiles. Dans la phase fluide, encore appelée phase liquide-désordonnée (L_{α} ou L_d), les lipides perdent leur état de compaction (isomérisation *trans*-gauche). Les diffusions rotationnelles et latérales sont alors favorisées. La transition entre ces deux états extrêmes se produit à une température spécifique, la température de transition de phase (T_m). Pour certains lipides, le passage de l'état fluide/gel se produit en deux étapes. En effet, une première transition peut être observée quelques degrés en dessous de la T_m , se traduisant par une allure plissée, appelée phase « ripples » (P_{β}). En présence de Chol, la membrane peut adopter une phase extra-lamellaire, appelée phase liquide-ordonnée (L_o) qui présente des caractéristiques de la phase fluide (mobilité élevée des lipides) et de la phase gel (état de compaction important). D'après (Eeman & Deleu, 2010).

Aussi, en présence de cholestérol, les bicouches lipidiques peuvent adopter une phase dite liquide-ordonnée (L_o) (Figure 4), qui possède des caractéristiques des deux phases, gel et fluide (Hjort Ipsen et al, 1987). En effet, l'ajout de cholestérol permet d'ordonner les lipides, induisant une forte compaction se rapprochant de celle des lipides en phase gel. Cependant, la phase L_o est également caractérisée par des diffusions rotationnelles et latérales proches de

celles des phases L_{α} . Ainsi, la phase L_0 conserve une grande rigidité sans pour autant perturber la mobilité des lipides.

Pour certains lipides, comme la DPPC², un état de phase intermédiaire peut être atteint : la phase « ripple » (P_{β}). Cette phase est caractérisée par des ondulations périodiques à la surface de la bicouche (Heimburg, 2000) et correspond donc à des arrangements périodiques entre phase fluide et phase gel (Figure 4). L'apparition de cette phase pourrait être expliquée par le couplage entre la courbure membranaire et l'inclinaison des chaînes (Lubensky & MacKintosh, 1993), ou encore par les interactions électrostatiques entre têtes polaires et molécules d'eau (Doniach, 1979). Plus récemment, Kaasgaard et al. (Kaasgaard et al, 2003) ont mis en évidence différents types de phases « ripples » (Figure 5).

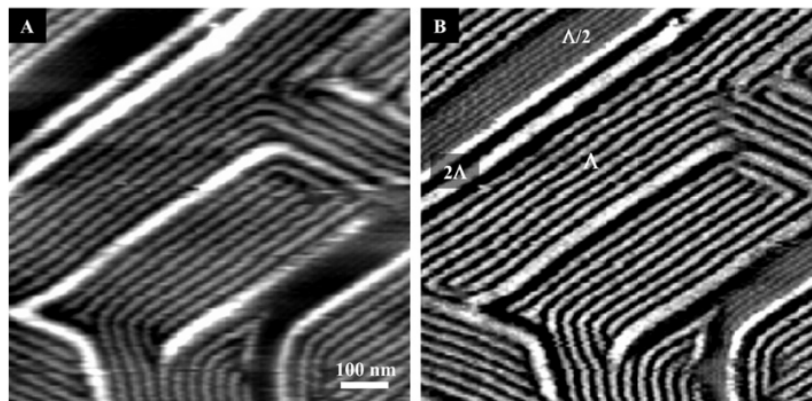


Figure 5. Images AFM d'une bicouche de DPPC montrant différentes phases « ripples ».

L'image de hauteur (A) et de déflexion (B) montrent l'existence de trois types de « ripples » : $\Lambda/2$, Λ , et 2Λ , chacun caractérisé par une périodicité de 15, 28, 55 nm et une amplitude $>1,2$, >5 et de 11 nm respectivement. D'après (Kaasgaard et al, 2003)

A partir des différents états physiques décrit ci-dessus, la notion de ségrégation de phase peut être introduite. En effet, au sein d'une bicouche constituée de lipides de différentes natures, différents états de phase peuvent coexister. Cette ségrégation de phase, de différents composés en fonction de la température, illustre bien le principe de la formation de domaines dans les modèles membranaires. Cependant, il est admis, depuis longtemps maintenant, que la phase gel n'existe pas dans les membranes biologiques (Parasassi et al, 1993).

² DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

I.4. Organisation des lipides dans la membrane

I.4.1. Asymétrie membranaire

La composition lipidique des membranes biologiques n'est pas symétrique. En effet, la nature des lipides composant chacun des feuillet est différente. Ainsi, les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylsérines (PS) sont principalement localisés dans le feuillet interne de la membrane plasmique, alors que le feuillet externe est composé majoritairement de phosphatidylcholines (PC) et de sphingomyélines (SM) (Rothman & Lenard, 1977). En ce qui concerne la distribution du cholestérol, il est admis que celui-ci soit présent dans les mêmes proportions quel que soit le feuillet membranaire grâce à sa capacité de diffusion transversale (Müller & Herrmann, 2002). Cette asymétrie permettrait, entre autres, à la membrane de se courber lors des processus de fusion membranaire ou de bourgeonnement de vésicules. De plus, il a été montré récemment que cette asymétrie contribuerait au potentiel membranaire (Gurtovenko & Vattulainen, 2008). Enfin, en plus de l'asymétrie entre les deux feuillet, il peut exister, nous l'avons vu précédemment, une séparation de phase sur un même feuillet.

I.4.2. Orientation des phospholipides dans la membrane

I.4.2.1. Orientation des têtes polaires

Les groupements polaires des phospholipides, et notamment les têtes de PC, sont orientés parallèlement au plan de la bicouche, grâce à la liaison phosphodiester en conformation *trans-trans* (Seelig et al, 1977).

I.4.2.2. Orientation des chaînes aliphatiques

En fonction du taux d'hydratation, les chaînes hydrocarbonées des lipides en phase gel (voir I.3. Etats physiques des membranes) peuvent être inclinées d'un certain angle (phase $L_{\beta'}$) ou non (phase L_{β}) par rapport à la normale de la bicouche (Figure 6 A). L'angle de « tilt » est d'autant plus grand que les lipides sont hydratés. Ainsi, la nature de la tête polaire représente un paramètre clé dans l'orientation des chaînes alkyles (McIntosh, 1980). En effet, les chaînes hydrophobes d'un PC hydraté sont inclinées d'environ 30° par rapport à la normale, alors que celles d'un PE ne sont quasiment pas déviées.

Des travaux récents, ont même permis de visualiser, à plus grande échelle, l'orientation des chaînes hydrocarbonées au sein d'un domaine lipidique de DPPC (Bernchou et al, 2009a). En effet, grâce à des expérimentations de fluorescence réalisées avec le LAURDAN, les auteurs ont démontré que les chaînes aliphatiques s'orienteraient différemment au sein du domaine, lui donnant l'impression d'avoir une « texture organisée » (Figure 6 B).

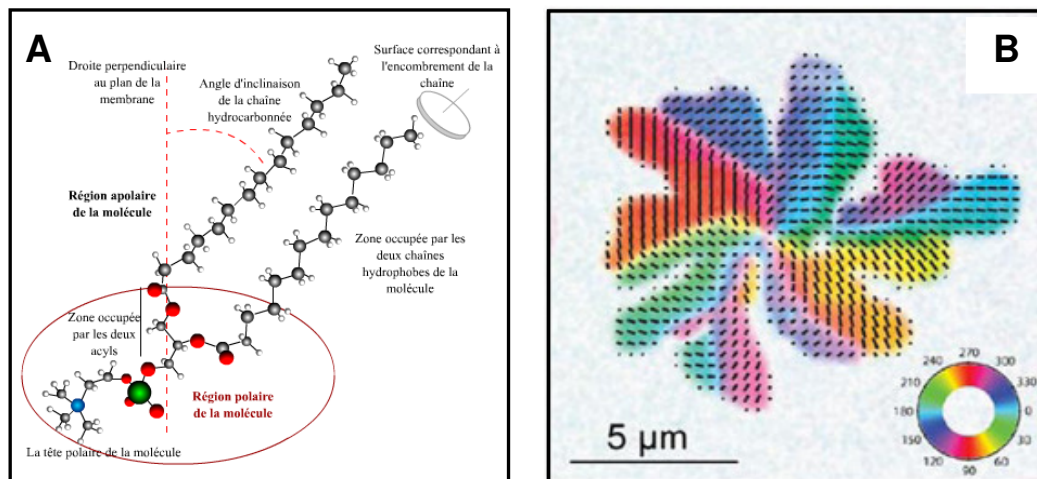


Figure 6. Organisation des chaînes aliphatiques des lipides au sein d'un domaine membranaire.

Le squelette de glycérol est normal par rapport au plan de la bicouche. Pour la DMPC³, l'angle d'inclinaison est de 12° (A). Si les chaînes hydrophobes sont inclinées, elles peuvent ne pas être toutes orientées dans le même sens. Des mesures de fluorescence ont montré que les domaines de DPPC présenteraient une « texture orientée » (B). Schéma de droite adapté de (Bagatolli et al, 2010).

I.5. Les rafts lipidiques

Parallèlement au très célèbre modèle de la « mosaïque fluide » de Singer et Nicholson en 1972, un groupe de biophysiciens a montré que les lipides pouvaient, sous certaines conditions, s'organiser en domaines distincts aux caractéristiques structurales particulières (Gebhardt et al, 1977; Shimshick & McConnell, 1973). Dans cette nouvelle conception des membranes, la nature des lipides joue un rôle important dans la formation de ces domaines dont il existe probablement plusieurs types. Depuis, l'existence de telles structures a été imaginée par Simons et Van Meer (Simons & Van Meer, 1988) en s'appuyant sur les travaux précédents ainsi que les bases biophysiques liées aux propriétés lipidiques. Ce n'est qu'en 1997, que Simons et Ikonen présentent le concept d'hétérogénéité latérale des membranes biologiques, en employant le terme de « raft » (Simons & Ikonen, 1997). Ces « rafts

³ DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

lipidiques » seraient formés grâce à l'association latérale des sphingolipides sur le feuillet externe, les espaces entre les chaînes de ces lipides étant comblés par des molécules de cholestérol. Ces plateformes lipidiques fonctionneraient donc en ségréant des composants membranaires (de nature lipidique et protéique) à l'intérieur de la membrane cellulaire.

I.5.1. Intervention du cholestérol dans la formation des domaines

Pour qu'il y ait formation de domaines dans les membranes biologiques, il faut qu'il y ait immiscibilité entre deux phases fluides. C'est ce que l'on observe lorsque le cholestérol est présent. Très important dans les membranes cellulaires, il peut atteindre jusqu'à 40 % (molaire) des lipides membranaires. Le rôle du cholestérol dans la formation des domaines a été essentiellement étudié sur des modèles membranaires. Le mélange lipidique le plus simple, mimant les membranes des cellules, correspond à un mélange ternaire composé de sphingolipides (formant des phases gels à température ambiante), de phospholipides (formant des phases fluides à température ambiante) et de cholestérol. Le cholestérol va contribuer à ordonner les lipides (en organisant les chaînes hydrophobes) tout en augmentant (ou tout du moins ne la perturbant pas) la fluidité membranaire.

I.5.2. Propriétés et rôle des rafts biologiques

Comme évoqué au dessus, le concept de rafts lipidiques repose sur le fait que les lipides jouent un véritable rôle dans la formation de ces microdomaines, suscitant de nombreuses controverses, aujourd'hui encore. Cependant, cette émulation a permis de développer cet axe de recherche et notamment sur les interactions lipides/protéines. De ce fait, beaucoup de travaux se sont intéressés à leur stabilité, leur taille ou encore leur dynamique. Malgré les divergences sur ces caractéristiques, une définition des rafts a pu être proposée en 2006 (Pike, 2006) : « *les rafts membranaires sont des domaines de petites tailles (10-200 nm), hétérogènes, très dynamiques, enrichis en stérols et sphingolipides, qui compartimentalisent des processus cellulaires. Ces petits rafts peuvent être parfois stabilisés pour former des plateformes plus grandes grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides* ».

I.5.1.1. Localisation et taille des rafts dans les cellules

Les rafts sont censés exister dans les membranes cellulaires qui renferment sphingolipides et cholestérols en quantité suffisante. Dès lors, connaissant la composition lipidique des

membranes, il serait aisé de conclure sur la présence ou pas de rafts. Les rafts ont été majoritairement localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules (Brown & London, 1998) et au niveau de quelques organites (Pelkmans et al, 2001). Au sein de la cellule, la répartition des rafts peut ne pas être homogène et varie selon le type cellulaire. Ainsi, dans les cellules neuronales, les rafts seraient localisés principalement au niveau de la membrane plasmique axonale (Kamiguchi, 2006). Cependant pour les autres cellules non polarisées, la distribution semblerait être plus homogène.

La taille des rafts demeure encore sujet à débat. En effet, dans la littérature, la taille des rafts est assez variable et dépend de l'outil de mesure utilisé (AFM, SPT⁴, FRET⁵ ou diffraction des rayons X). Ces tailles varient de 10 nm à plusieurs micromètres (de Almeida et al, 2005; Dietrich et al, 2002; El Kirat & Morandat, 2007).

1.5.1.2. Organisation des rafts

Les rafts sont des structures assez complexes composées de lipides, nous l'avons vu (sphingolipides, cholestérol), et d'une variété de protéines ayant aussi un rôle crucial. La nature des protéines varie selon le type de cellule, et la fonction du raft lipidique formé. Cependant, la présence de protéines à ancrage GPI (Milhiet et al, 2002), de protéines acylées, ou encore de protéines transmembranaires se fixant au glycosphingolipides ont été identifiées (Simons & Sampaio, 2011).

Les mécanismes contrôlant la biogenèse, l'activité puis la dissociation des rafts sont encore mal connus. Cependant, des travaux intéressants ont supposé un couplage entre rafts et éléments du cytosquelette. En effet, ce couplage serait alors impliqué dans la transduction du signal, et notamment dans la signalisation neuronale (Allen et al, 2007).

1.5.1.3. Implication des rafts dans la signalisation cellulaire

Une des fonctions majeures des rafts à la membrane cellulaire est la transduction du signal (Simons & Toomre, 2000). Il faut alors considérer les rafts comme une véritable plateforme dynamique (Figure 7 (1) et (2)) permettant le recrutement de récepteurs.

⁴ Single particle tracking : technique qui permet d'observer le déplacement de molécules individuelles (en x, y et z) en utilisant des molécules fluorescentes ou des marqueurs optiques (l'or par exemple)

⁵ Foster Resonance Energy Transfer : technique de mesure de la fluorescence, fondée sur le transfert d'énergie entre un donneur et un receveur lorsqu'ils sont suffisamment proches.

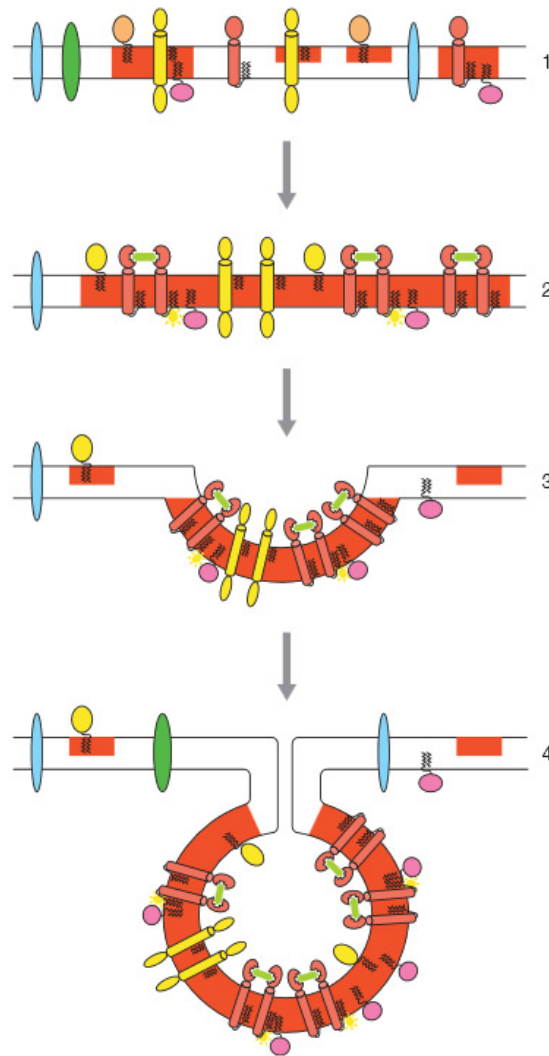


Figure 7. Formation des plateformes lipidiques et implication des rafts dans les processus de bourgeonnement.

Avant de se regrouper, les protéines s'associent avec les rafts (orange) en de petits domaines (1). Les domaines se regroupent induisant la formation d'une plateforme lipidique et activant la dimérisation des protéines (2). Formation du bourgeon (3 et 4) probablement due au regroupement très concentré des protéines et aux éléments du cytosquelette favorisant l'incurvation de la membrane. D'après (Simons & Sampaio, 2011)

De plus, les rafts seraient également impliqués dans l'adressage apical. En effet, des travaux de Schuck et Simons (Schuck & Simons, 2004) ont montré que certaines protéines transmembranaires n'auraient pas une affinité intrinsèque pour les rafts mais que leur regroupement ou leur oligomérisation pouvait augmenter leur affinité ou les stabiliser dans ces domaines (Figure 7).

Nous l'avons vu au travers de cette partie, les membranes biologiques sont des systèmes vraiment très complexes. Même, si les bases physico-chimiques des lipides sont maintenant connues de toute la communauté scientifique, de nombreux points demeurent encore sujets à controverse. Par conséquent les modèles membranaires biomimétiques se sont, petit à petit, imposés comme des outils incontestables pour l'étude les propriétés membranaires, mais aussi pour l'investigation des effets de diverses molécules sur l'activité membranaire.

Chapitre II. Les modèles membranaires biomimétiques

Depuis maintenant près de 85 ans, les modèles membranaires lipidiques ont été utilisés comme outils de choix pour étudier d'une part, la structure fondamentale et l'organisation des membranes biologiques et d'autre part, d'appréhender les aspects plus dynamiques. Parmi les différents modèles membranaires lipidiques disponibles, trois systèmes ont été utilisés dans ce travail de thèse : les monocouches de Langmuir, les liposomes et les SLBs.

II.1. Les monocouches lipidiques

II.1.1. Bref historique

Les monocouches lipidiques ou films de Langmuir ont été historiquement les premières expérimentations reliées à notre conception actuelle des membranes biologiques. Irving Langmuir, en 1917 (Langmuir, 1917), fut le premier à développer les concepts théoriques et expérimentaux de comportement des molécules à l'interface air/eau. Inventeur de la cuve portant son nom, il montra comment former un film lipidique, à la surface de l'eau. Ces travaux lui ont valu le prix Nobel de chimie en 1932. En 1925, en utilisant cette cuve de Langmuir, deux physiciens allemands, ont notamment découvert que les membranes cellulaires étaient organisées en bicouche (Gorter & Grendel, 1925). Dix ans plus tard, Katherine Blodgett dévoile comment obtenir, par dépôts successifs, des multicouches sur un support solide, à partir d'un film monomoléculaire (Blodgett & Langmuir, 1937).

II.1.2. Principe de formation d'une monocouche

Les films de Langmuir sont formés par étalement à la surface air/eau, d'une solution de lipides, solubilisés dans un solvant organique. Grâce à leur propriété amphiphile, les molécules lipidiques vont tout simplement s'organiser sur la totalité de la surface disponible, orientant les queues hydrophobes à l'air et le groupement polaire dans la phase aqueuse. Le rapprochement ou l'éloignement des barrières mobiles, oblige les lipides à s'auto-organiser d'une manière plus ou moins condensée (Figure 8).

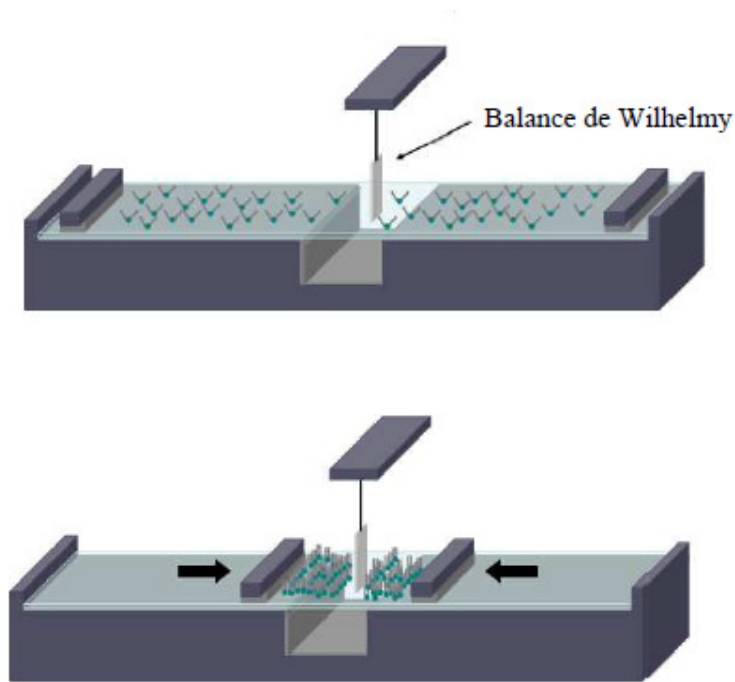


Figure 8. Principe de formation d'une monocouche par la technique de Langmuir

L'état de compaction du film lipidique est déduit grâce aux mesures de la pression de surface. Elles sont mesurées par la méthode de la lame de Wilhelmy.

II.1.3. Mesure de la pression de surface

Ce dispositif de Wilhelmy, permet donc de mesurer les tensions de surface exercées sur une lame suspendue, partiellement immergée dans le liquide (Figure 9). Cette lame, est soumise à une force verticale, notée F , dirigée vers le bas (Figure 9).

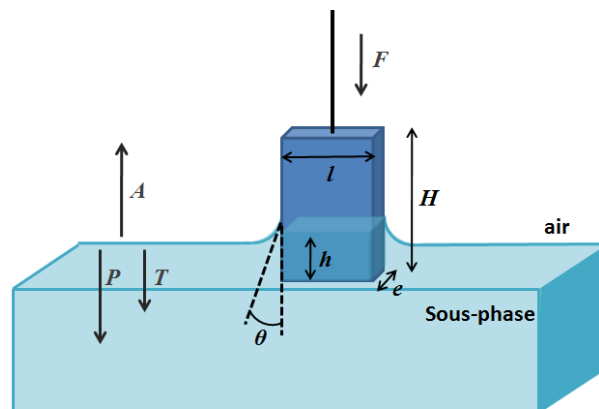


Figure 9. Principe de mesure par la balance de Wilhelmy

Cette force F (en Newton) est la résultante du poids de la lame (P), de la poussée d'Archimède (A) ainsi que de la force (T) due à la tension superficielle (Figure 9). Ainsi, on a :

$$F = \rho_l e l H g - \rho_e e l h g + 2\gamma (e+1) \cos\theta$$

Avec : ρ_e et ρ_l , les masses volumiques de l'eau (ou du solvant) et de la lame respectivement
 g , la pesanteur, égale à 9,81 N/kg
 H , la hauteur totale de la lame
 l , la largeur de la lame
 e , l'épaisseur de la lame
 h , la hauteur de la partie immergée
 θ , l'angle de contact entre la lame et le liquide
 γ , la tension superficielle

La pression de surface est mesurée par soustraction de la force F du film lipidique, exercée sur la lame, par la force du liquide seul, exercée sur la lame. Ainsi, la différence de force, ΔF , ne sera relié que par la variation de tension de surface, définit par :

$$\Delta F = 2 (e+1) (\gamma_0 \cos\theta_0 - \gamma \cos\theta)$$

La lame utilisée, étant en papier Whatmann, est parfaitement mouillable, et par conséquent, les angles θ_0 et θ sont nuls. Ainsi, la pression de surface (π , en N/m), représentant la différence des tensions superficielles ($\gamma_0 - \gamma$) est déterminée par la relation suivante :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma = \Delta F / 2 (e+1)$$

II.1.4. Les isothermes de compression

En application directe de cette mesure de pression de surface, les interactions lipides/lipides et lipides/molécules peuvent être très facilement étudiées par des isothermes de compression, entre autres. En effet, ceux-ci sont obtenus en mesurant la pression de surface (π) en fonction de l'aire moléculaire moyenne (A), occupée par une molécule déposée à l'interface air/eau.

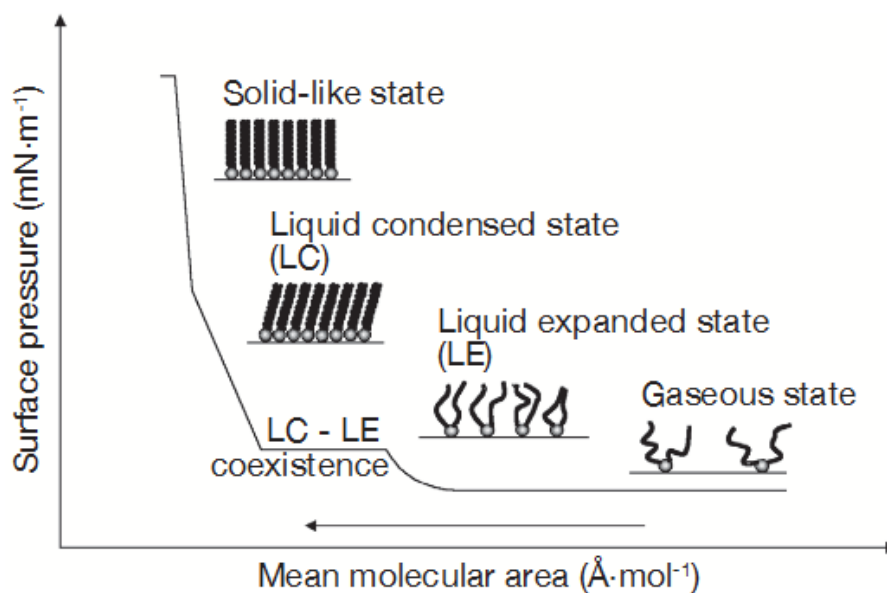


Figure 10. Isotherme de compression théorique

Compression d'une monocouche lipidique insoluble, étalée à une interface air/eau. Initialement les lipides sont à l'état de phase gazeuse, puis, par compression, ils évoluent de la phase liquide expansé (LE) à une phase liquide condensé (LC) puis enfin, avant d'atteindre le collapse, à une phase solide. D'après (Eeman & Deleu, 2010)

Sous l'effet de la compression, par rapprochement des barrières, la monocouche adopte différents états de phase. Les lipides sont tout d'abord à l'état dit gazeux (où les lipides n'interagissent pas entre eux). Par compression de la monocouche, celle-ci passe alors à un état « liquide expansé », LE (où les chaînes hydrophobes interagissent entre elles), puis à un état « liquide condensé », LC (augmentation du niveau d'organisation). Enfin, lorsque les molécules sont au maximum de leur compaction, la monocouche est à l'état dit solide (Figure 10). Le passage par ces états exprime les différents niveaux d'ordre conformationnels des molécules à l'interface et dénotent la présence d'interactions intermoléculaires au sein de la monocouche. Au-delà de la phase solide, la monocouche collapse, c'est-à-dire qu'elle perd son caractère bidimensionnel.

II.1.5. Propriétés thermodynamiques

Les interactions moléculaires, à l'interface air/eau, existant entre deux molécules de différentes natures, peuvent être évaluées par une simple analyse thermodynamique. En effet, à partir des isothermes de compression de chaque molécule pure, des informations sur le mélange des deux molécules peuvent être obtenues, et notamment sur la miscibilité ou

l'idéalité du mélange. La méthode d'étude des interactions entre films lipidiques et agents exogènes sera plus détaillée dans la partie Matériels et Méthodes (I.2. Les monocouches de Langmuir).

La méthode des monocouches de Langmuir peut être très facilement combinée avec des techniques optiques comme la microscopie de fluorescence (FM) ou encore la microscopie à angle de Brewster (BAM). Cette dernière a l'avantage de ne pas utiliser de sondes fluorescentes qui pourraient perturber le comportement de la monocouche à des pressions élevées (McConlogue & Vanderlick, 1997). Ces deux techniques permettent ainsi de visualiser l'organisation interfaciale des lipides au sein de la monocouche ou les changements de comportement (au niveau de la ségrégation de phase) après injection d'une molécule d'intérêt dans la monocouche. Le BAM ayant une résolution spatiale au mieux de 2 μm , l'AFM sera préféré pour la visualisation des propriétés de phase de la monocouche, à l'échelle nanométrique. Cependant, l'utilisation de l'AFM implique le transfert de cette monocouche sur un support solide pour l'observation. Lorsque le film lipidique est stabilisé à l'interface air/eau, deux types de transfert peuvent être réalisés : un transfert vertical, dit de « Langmuir-Blodgett » (LB), ou un transfert horizontal, dit de « Langmuir-Schaefer » (LS). Selon la nature du support, hydrophile ou bien hydrophobe, le prélèvement de la monocouche, à pression constante, se réalisera à l'émersion ou à l'immersion, respectivement. Ces supports pourront ensuite être directement visualisés par AFM (Dufrêne et al, 1997; Milhiet et al, 2001; Reviakine & Brisson, 2000). Ainsi, de nombreux travaux ont utilisé les monocouches de Langmuir, combinées avec la FM, la BAM ou encore l'AFM, pour caractériser les interactions lipides/peptides ou lipides/lipides en mesurant les variations de pression de surface (Ambike et al, 2011; Deshayes et al, 2005). Ces études ont permis, entre autres, de mieux comprendre le mode d'action des toxines (Theumer et al, 2008), ou encore de caractériser l'activité phospholipasique (El Kirat et al, 2002; He & Li, 2003; Li et al, 2000).

La technique de Langmuir peut également être directement combinée à diverses techniques de spectroscopie (Ahn & Franses, 1992; Subirade et al, 1995), de réflexion et de dispersion (Lösche et al, 1984; Reiter et al, 1993), afin d'obtenir des informations de la structure, la conformation et l'orientation des constituants de la monocouche.

II.2. Les vésicules lipidiques

Les vésicules lipidiques se distinguent des autres modèles membranaires par leur propriété versatile. Elles sont couramment utilisées pour étudier les processus de fusion membranaire, les interactions moléculaires, entre autres.

Selon leur méthode de préparation, différents types de structures peuvent être obtenus. En amont, un film sec est réalisé après évaporation du solvant organique, dans lequel les lipides étaient solubilisés. Après hydratation de ce film, et agitation mécanique, des liposomes multilamellaires (*Multilamellar Large Vesicles* en anglais, MLVs) peuvent être formées (Figure 11). Ces vésicules présentent un large spectre de taille de 0,5 à 10 μm .



Figure 11. Structure de différents liposomes

Représentation d'un liposome unilamellaire (à gauche), composé d'une unique bicouche, et d'un liposome multilamellaire ou MLV (à droite), caractérisé par plusieurs bicouches lipidiques concentriques. Pour les MLVs, chaque membrane est séparée par un film fin de molécules d'eau. Figure tirée du site : http://www.encapsula.com/products_01.html

Les MLVs peuvent être réduites en taille et homogénéisées par d'autres traitements mécaniques. Par exemple, l'extrusion de ces vésicules, à travers une membrane poreuse, conduit à la formation de LUVs, pour « Large Unilamellar Vesicles » dont la taille est généralement comprise entre 100 et 500 nm (Olson et al, 1979). Des vésicules plus petites, appelées SUVs (pour « Small Unilamellar Vesicles »), de diamètre inférieur à 100 nm, sont obtenues par sonication (Huang, 1969). Enfin, des vésicules géantes (*Geant Unilamellar Vesicles* en anglais, GUVs) sont quant à elles obtenues par hydratation d'un film sec, à une température supérieure à la T_m pendant au moins 36 h, ou bien par la méthode d'électroformation (Bagatolli et al, 2000; Rodriguez et al, 2005; Wesolowska et al, 2009). Ces

GUVs peuvent être directement visualisées par microscopie optique (fluorescence ou confocal) grâce à leur grande taille.

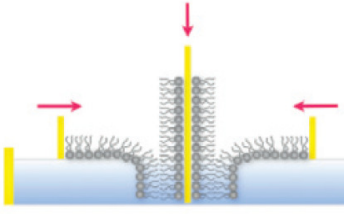
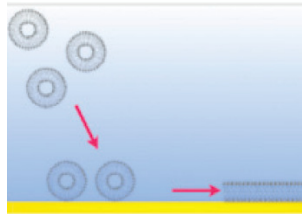

Les liposomes ont également été très utilisés pour étudier les propriétés de perméabilité (Van Bambeke et al, 1993) ou de fluidité (Parasassi et al, 1991) des membranes lipidiques. Depuis peu, les vésicules lipidiques sont employées en tant que système d'encapsulation de médicaments, protéines, ou enzymes (Peetla et al, 2009), et constituent maintenant des vecteurs de choix dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques.

II.3. Les bicouches lipidiques supportées

Les SLBs sont des modèles membranaires plans formés généralement sur un support hydrophile (mica, verre, oxyde de silicium). Plus stables que les vésicules lipidiques et confinées sur un support solide, les SLBs peuvent être caractérisées par diverses techniques comme l'AFM (Goksu et al, 2009; Lin et al, 2007), la microscopie de fluorescence (Crane & Tamm, 2007), d'ellipsométrie (Bruun Nielsen & Simonsen, 2013; Nielsen & Simonsen, 2013; Puu & Gustafson, 1997), la microbalance à quartz (Keller & Kasemo, 1998; Nielsen & Otzen, 2013) ou encore à la réflectivité des neutrons (Wacklin & Thomas, 2007). Différentes méthodes sont utilisées pour préparer des SLBs (Tableau 2) : (i) la fusion de liposomes, (ii) le transfert de monocouches de Langmuir et (iii) le dépôt par enduction centrifuge.

La première méthode est fondée sur le dépôt successif de deux monocouches lipidiques par transfert de LB ou LS. Une première monocouche est transférée sur un substrat hydrophile en traversant verticalement l'interface. Un second film lipidique est déposé en sens inverse formant ainsi la bicouche lipidique. Ces transferts sont néanmoins délicats à mettre en œuvre et les SLBs générées présentent beaucoup de défauts (trous).

Tableau 2. Méthodes usuelles pour préparer des SLBs : Avantages et inconvénients

	Transfert de Langmuir-Blodgett ou de Langmuir-Schaeffer	Fusion de vésicules	Enduction centrifuge (spin coating)
			
Avantages	Bicouches asymétriques (pression de surface et composition)	Méthode simple Peu de défauts	Absence de défauts Bicouches simple ou multiples
Inconvénients	Présence de défauts – membranes discontinues	Bicouches symétriques	Bicouches symétriques Utilisation de solvants organiques
Références	(Rinia et al, 1999)	(Horn, 1984)	(Simonsen & Bagatolli, 2004)

D’après (Picas et al, 2012)

La méthode de fusion de vésicules est de loin la plus employée, par sa simplicité de réalisation. Une suspension de vésicules lipidiques est préparée comme détaillée dans la section précédente, puis est déposée sur un support hydrophile. Au contact du support, les vésicules se déforment jusqu’à leur rupture sur le support formant ainsi, une bicouche lipidique plane. Enfin, à la fin du processus de fusion, la SLB formée est rincée pour enlever les vésicules non fusionnées.

Le choix du support est un élément essentiel pour générer des SLBs. En effet, Silin *et al.* ont tout d’abord montré l’influence de l’énergie de surface dans la formation des SLBs en réalisant des fusions de liposomes sur des surfaces d’or fonctionnalisées avec des mélanges de thiols (polaires et non polaires). D’après leurs travaux, l’utilisation d’une surface hydrophile, possédant une énergie de surface élevée, provoquerait la rupture des liposomes sur le support et leur organisation en bicouche (Silin et al, 2002). Plus tard, une autre équipe s’est proposée d’étudier l’influence de la charge du support sur la formation de SLBs. Ainsi, Cha *et al.* ont

constaté, en utilisant la technique de FRAP⁶, que les interactions électrostatiques lipides/support sont primordiales pour former des SLBs sur les surfaces d'or (Cha et al, 2006). Plus récemment, Ip *et al.* se sont intéressés à l'influence de la nature du support (or et mica) sur la ségrégation de phase au sein d'une SLB (Ip et al, 2010). Ils ont pu vérifier que la morphologie des domaines dépendait de la chimie de surface et que celle-ci influait sur les propriétés nanomécaniques des SLBs. Le rôle de ces charges, et notamment celui de la présence d'ions divalents de calcium, a été étudié dans divers travaux. La présence de calcium favoriserait la formation de SLBs, probablement en modifiant les énergies d'interactions support/liposomes et liposomes/liposomes, comme l'ont supposé Seantier et Kasemo (Seantier & Kasemo, 2009).

Le mécanisme de formation de SLBs (interactions mises en jeu, rôle des ions divalents, rôle du support), nous venons de le voir, suscite encore beaucoup d'interrogations. Ainsi, en 2006, une étude complète a été menée par l'équipe de Richter, en proposant différents mécanismes de rupture des vésicules (Richter et al, 2006). Quatre ans plus tard, grâce à l'utilisation du « High Speed » AFM (HS-AFM, voir la partie III.5.3. Le « High Speed » AFM), la formation d'une SLB, par la méthode de la fusion de vésicules, a même pu être visualisée pour la première fois. Ainsi, les SLBs seraient formées par l'adsorption puis la rupture de membranes tubulaire de 20 nm environ et de vésicules lipidiques de 7,5 à 30 nm de hauteur.

⁶ FRAP : technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

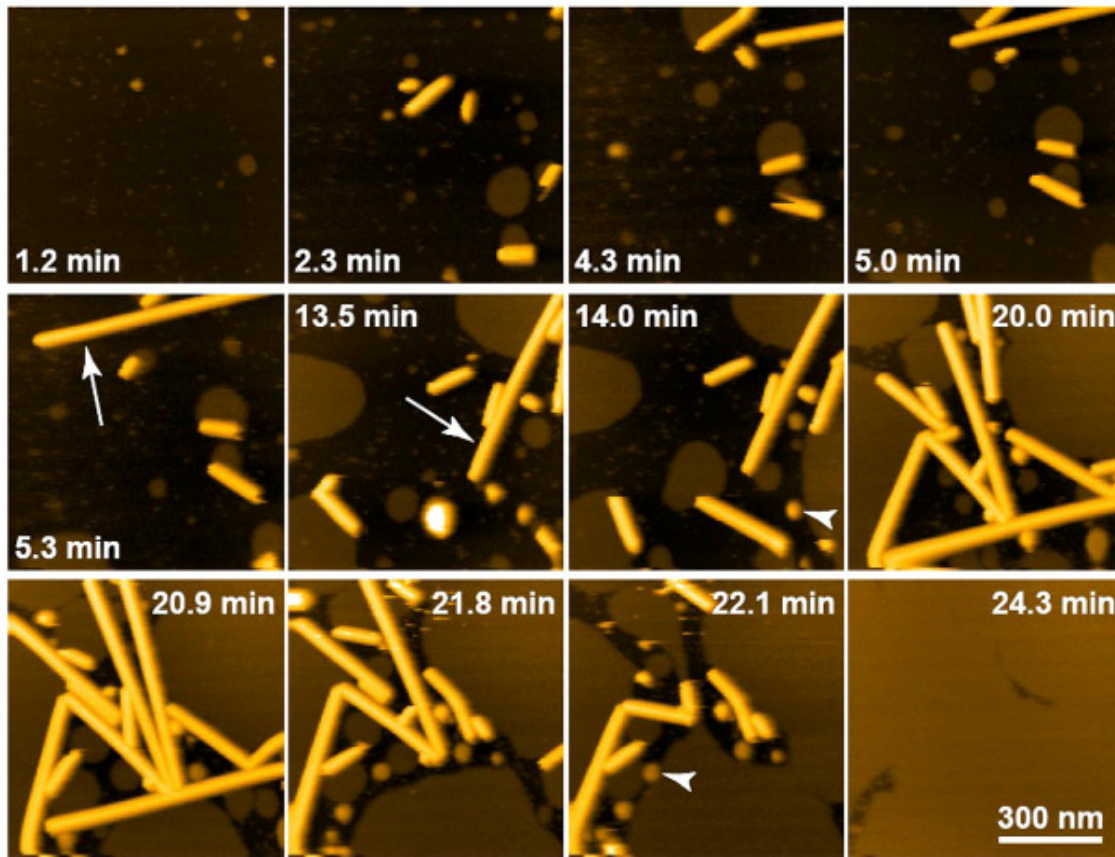


Figure 12. Formation d'une SLB visualisée par High Speed AFM en temps réel⁷

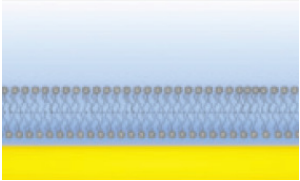
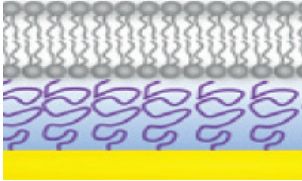
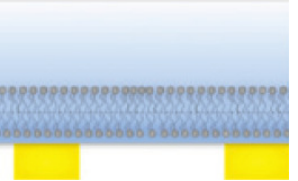
Les membranes sont constituées d'un mélange ternaire de DOPC/DOPS/DPPE biotinylées. La suspension de lipides est déposée dans la cellule du HS-AFM puis imagée en continu (1.026 s/image). La SLB est formée à partir de membranes lipidiques tubulaires (flèches) et de liposomes (curseurs). Taille des images : 800 nm× 800 nm, échelle en z = 25 nm. D'après (Giocondi et al, 2010)

D'autres méthodes ont été proposées pour préparer des SLBs, comme par exemple l'enduction centrifuge (Tableau 2). Ces membranes sont formées par étalement d'une solution organique de lipides. Après évaporation, le film est hydraté avec un tampon approprié. Le principal défaut de cette technique est la difficulté à contrôler le nombre de bicouches déposées sur le support qui varie en général de 2 à 30 bicouches (Simonsen & Bagatolli, 2004).

Bien que la plupart des études sont menées sur des supports solides, il n'est pas exclu d'utiliser d'autres types de support (Tableau 3), qui ont été développés pour des applications bien spécifiques (Knoll et al, 2008).

⁷ Film disponible sur : <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/BBA/lipid.htm>

Tableau 3. Différents types de support utilisés pour former des SLBs : avantages et inconvénients

	support solide	Coussin de polymère	Support poreux
			
Avantages	Bon recouvrement Facilité d'imagerie (haute résolution)	Peu d'interaction avec le support	Pas d'interaction avec le support
Inconvénients	Interaction avec le support	Difficile à imager Diffusion latérale restreinte	Recouvrement délicat
Références	(Richter et al, 2006)	(Tanaka & Sackmann, 2005)	(Steltenkamp et al, 2006)

D'après (Picas et al, 2012)

II.4. Pertinence et limitation des modèles membranaires

Depuis le siècle dernier, les modèles membranaires ont prouvé leur pertinence en jouant un rôle déterminant dans l'élucidation de la structure et de l'organisation dynamique membranaire.

Cependant ces systèmes membranaires sont limités et ne reproduisent pas toute la complexité des membranes biologiques. Alors que la simplification des membranes est cruciale pour l'analyse des interactions moléculaires spécifiques, cela peut constituer parfois un obstacle à la compréhension de certaines fonctions membranaires.

Le nombre de composants pouvant être incorporé dans un système modèle est relativement restreint, ceci étant dû, en grande partie, aux contraintes expérimentales ainsi qu'à la technologie employée. Par exemple, la plupart des études biophysiques fondées sur les modèles membranaires ne considèrent que trois voire quatre lipides différents, alors que les membranes biologiques en sont constituées de milliers (van Meer, 2005). Une autre limitation est la difficulté d'incorporer des protéines dans les membranes (Rossi & Chopineau, 2007). En effet, protéines et lipides font très fréquemment l'objet d'études distinctes et les protéines sont relativement peu étudiées dans leur contexte. Cependant, tous deux interagissent entre eux et contribuent, ensemble, aux aspects fonctionnels des membranes biologiques. De plus, jusqu'à maintenant, l'asymétrie lipidique entre les deux feuillettes n'a que très peu fait l'objet

d'études abouties, bien que celle-ci joue un rôle fonctionnel essentiel au sein de la membrane plasmique (Manno et al, 2002). De plus, les modèles membranaires ne contiennent aucun élément du cytosquelette qui participe activement à la diffusion des lipides et des protéines au sein de la membrane. L'armature intracellulaire, que constitue le cytosquelette, peut être assimilée au support sur lequel reposent les SLBs, mais ne peut cependant pas retranscrire la dynamique associée.

Malgré toutes ces limitations, deux constats peuvent être établis : les avancées technologiques sont telles, que les limitations d'aujourd'hui seront dépassées dans peu de temps. De plus, le fait de cloisonner les constituants (études sur lipides et protéines séparément, choix d'une ou deux compositions différentes) permet d'analyser la contribution de chaque élément constituant la membrane. Ces « travaux préliminaires » sont ainsi essentiels et lorsque la technique le permettra, les systèmes pourront se complexifier davantage, et les interactions entre les éléments pourront être ainsi déterminées.

Finalement, ces systèmes biomimétiques, et notamment les SLBs, constituent un excellent modèle pour les études en microscopie à force atomique. Ainsi, de nombreux travaux se sont intéressés à l'interaction des SLBs avec des enzymes (El Kirat et al, 2008), des peptides (El Kirat et al, 2006) ou encore avec des détergents (Morandat & El Kirat, 2006). Ces aspects feront l'objet d'un chapitre entier (Chapitre IV. Etude des membranes biomimétiques par AFM).

Chapitre III. La microscopie à force atomique

III.1. Historique

L'invention du microscope à effet tunnel (*Scanning Tunneling Microscopy* en anglais, STM) en 1981 avait pour vocation d'imager des structures à l'échelle atomique (Binnig et al, 1982). Hautement résolutif et sensible, l'idée de l'utiliser en biologie est venue très rapidement après son invention. Cependant, cette technique n'était pas adaptée pour ce genre d'application⁸. Une variante du STM, permettant l'imagerie de surfaces conductrices et non-conductrices, aussi bien à l'air qu'en liquide, vit le jour en 1986 grâce aux travaux de Gerd Binnig, Calvin Quate et Christopher Gerber (Binnig et al, 1986). Les premiers travaux utilisant l'AFM pour des applications en biologie, rapportés par Andreas Engel en 1991 (Engel, 1991), concernaient la visualisation en milieu liquide du processus de coagulation du fibrinogène, après activation par la thrombine (Drake et al, 1989). L'AFM appliquée en biologie, connaît alors un bouleversement en 1994, grâce au développement de la spectroscopie de force, qui est utilisée pour la première fois pour mesurer les forces d'interactions entre deux biomolécules (Lee et al, 1994). Le mode contact intermittent (ou TappingTM mode) en liquide et le mode non-contact sont également employés pour la première fois. A partir de ce moment, l'AFM est devenu un outil technique extrêmement utilisé dans la communauté de biologistes avec de perpétuelles innovations, en termes instrumentales. Ainsi, les expérimentations en conditions physiologiques, même *in vivo*, ont été rendues possibles. Enfin, en 2001, T. Ando et P. Hansma ont proposé une autre variante, pouvant, cette fois-ci, visualiser les processus biologiques en « temps réel » grâce à une vitesse de scan extrêmement rapide, le High Speed AFM (Ando et al, 2001) .

⁸ Hermann E. Gaub confesse, lors d'une conférence (consultable en ligne), que l'utilisation du STM, selon sa propre expérience en biologie, n'était pas une méthode appropriée.
www.diffusion.ens.fr/index.php?res=conf&idconf=778

III.2. Principe physique de l'AFM

L'AFM repose sur l'interaction entre un microlevier, portant à son extrémité une pointe, et une surface (celle de l'échantillon). Les forces d'interaction mise en jeu (forces de répulsion ioniques, forces de van der Waals, forces électrostatiques, magnétiques...), entre la surface de l'échantillon et de la pointe, dépendent de leur distance de séparation (Figure 13) mais également de leur nature physico-chimique respective. A longue distance (dans la zone de non contact), la force est attractive, et résulte des interactions de type van der Waals (qui sont significatives jusqu'à des distances de 100 Å). A l'inverse, à courte distance (dans la zone de contact), la force est répulsive, résultant de l'interaction entre les nuages électroniques des atomes de la pointe et de la surface. Cette force, très forte, empêche la pénétration de la pointe à l'intérieur de l'échantillon et entraîne la déformation du levier et/ou de la surface.

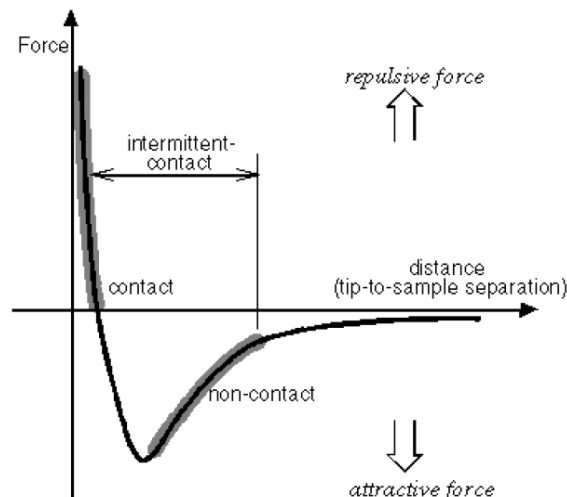


Figure 13. Forces d'interactions entre la pointe et la surface de l'échantillon

L'échantillon est tout d'abord déposé sur un scanner à céramiques piézoélectriques (Figure 14 A). Sous l'effet d'une tension, ces céramiques sont capables de se dilater et de se contracter, ce qui va permettre le déplacement de l'échantillon dans les trois dimensions (x, y et z). Un faisceau laser est focalisé sur le dos du microlevier recouvert d'or, permettant ainsi la réflexion de celui-ci vers un système optique constitué de photodiodes (Figure 14 A). La distance entre la pointe et l'échantillon est contrôlée avec une précision de l'ordre du dixième de nanomètre. Lorsque la pointe rencontre un élément de topographie, par déplacement de l'échantillon, le microlevier subit alors une déflexion due aux forces d'interactions. Cette

déviations est ensuite enregistrée par le détecteur optique, grâce au déplacement du faisceau laser.

Un système d'asservissement relie les informations détectées par la photodiode à la position du tube piézoélectrique. Il réajuste la position de l'échantillon pour conserver constante, (i) soit la valeur des forces d'interaction pointe/échantillon, (ii) soit la hauteur pointe/échantillon.

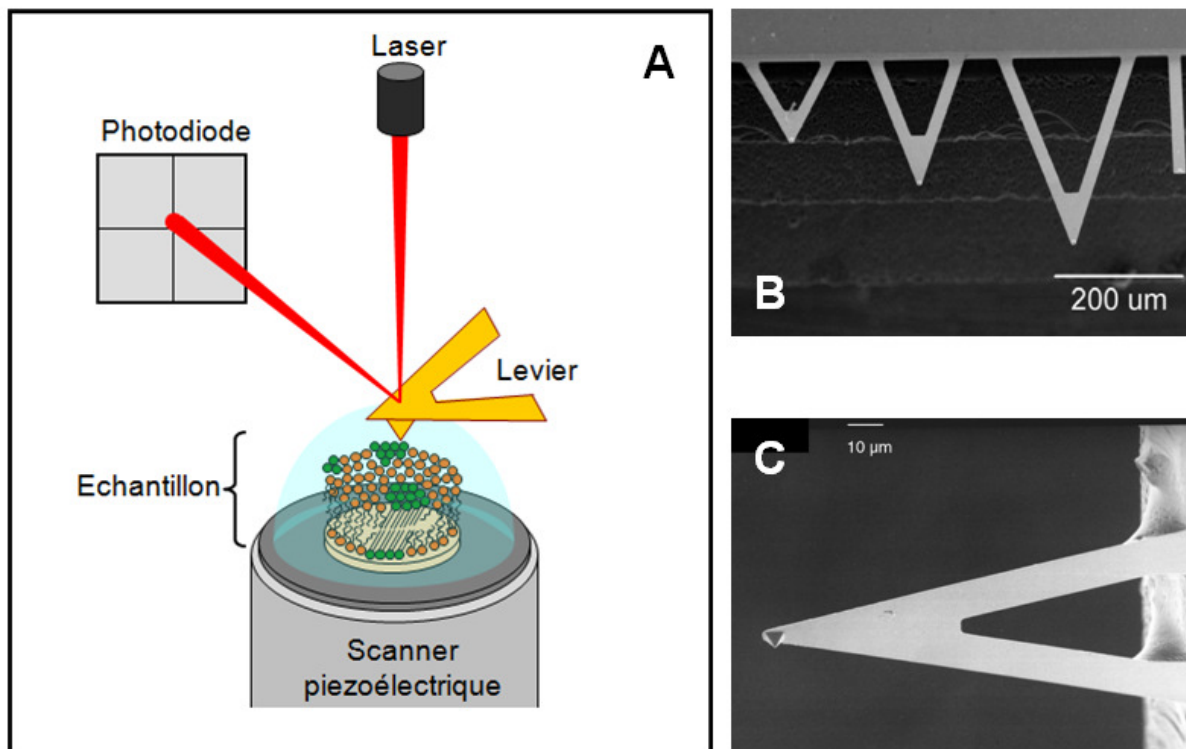


Figure 14. Principe de l'AFM (A) et images de microleviers (B et C)

Dans le schéma de gauche, le principe de l'AFM (A) est appliqué à l'imagerie d'une SLB en milieu liquide. Les images à droite, réalisées en microscopie électronique, représentent en (B) une série de microleviers en forme « V » de différentes constantes de raideur (k). Chaque microlevier présente à leur apex, une pointe (C), avec un rayon de courbure très faible, permettant le balayage de la surface de l'échantillon avec une très haute précision.

Les déplacements effectués par le tube piézoélectrique sont affichés à l'écran sous la forme d'une image dite « de hauteur », reflétant la topographie de l'échantillon. Les images de friction et de déflexion peuvent également être enregistrées simultanément. Les images de déflexion, étant établies à partir de la dérivée première du signal de hauteur, accentuent les variations de topographie.

Comme en microscopie électronique, la résolution de l'image dépend de deux paramètres : (i) du nombre de pixels et (ii) des dimensions de la pointe. En général, pour obtenir une image

AFM de bonne résolution, le nombre de pixels est de 256×256 ou de 512×512. Plus le nombre de pixels sera important, plus le temps d'acquisition de l'image sera long. De plus, les microleviers peuvent présenter à leur apex différents types de pointes : généralement coniques ou pyramidales, et parfois sphériques. Le rayon de courbure de ces pointes peut varier de 1 nm (lorsqu'un nanotube de carbone est fixé à l'extrémité d'une pointe par exemple) à plusieurs dizaines de nanomètres (~50 - 100 nm). Selon la taille de la pointe AFM, l'image de l'objet imagé sera plus ou moins élargi par rapport à sa taille réelle (Chicon et al, 1987). En effet, plus le rayon de courbure de la pointe sera faible, plus le contour sera suivi avec précision et donc, plus la largeur de l'objet imagé sera fidèle à sa taille réelle. Pour pallier ce problème, Santos et son équipe ont pu estimer les distorsions latérales appliquées à l'imagerie d'un objet sphérique (Figure 15). Par une simple application du théorème de Pythagore, ils ont pu mettre en relation le rayon réel de l'objet (r) avec le rayon de courbure de la pointe (R_{tip}), le rayon de l'objet mesuré sur l'image de topographie (r_{AFM}) ainsi que la hauteur de l'objet (h), grâce à la formule suivante (Santos et al, 1998) :

$$r = \sqrt{r_{AFM}^2 - 2R_{tip} \cdot h}$$

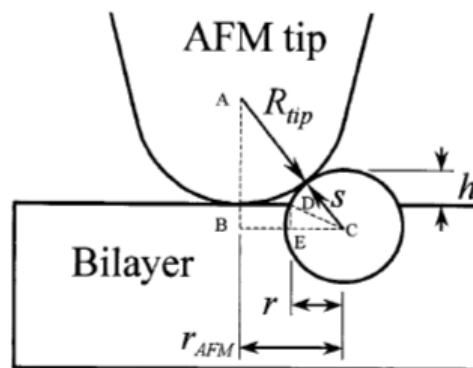


Figure 15. Mesure de la largeur réelle de l'objet biologique imagé

Modèle fondé sur le théorème de Pythagore calculant le rayon réel, r , de l'objet (assimilé à une sphère) en fonction du rayon de courbure de la pointe AFM, R_{tip} , du rayon « imagé », r_{AFM} et de la hauteur, h , mesurés sur l'image de topographie de l'échantillon. D'après (Santos et al, 1998)

Le choix de la forme des microleviers se fait en fonction du type d'expérimentation recherché. En effet, pour l'imagerie, la forme la plus adéquate sera les microleviers en forme « V » car ils minimisent les mouvements de torsion. Les poutres, elles, seront privilégiées pour mesurer, en plus de la topographie, les frictions entre la pointe et l'échantillon.

III.3. Les différents modes d'imagerie

Trois modes de fonctionnement de l'AFM peuvent être utilisés pour l'imagerie : le mode contact (le plus utilisé), le mode non-contact et le mode contact intermittent (ou mode Tapping™). L'AFM permet aussi de mesurer des forces entre la pointe et le support par des cycles d'approche/retrait. Ce mode, appelé spectroscopie de force, permet de quantifier des forces très diverses et peut être appliqué à de nombreux champs d'étude, reconnaissance moléculaire, propriétés mécaniques entre autres.

III.3.1. Mode contact

Le mode contact utilise les forces répulsives. La pointe effleure en continu la surface. Ainsi, elle est soumise à des interactions à courte distance (Figure 13). Deux modes de fonctionnement sont possibles : (i) le mode à force constante, avec un déplacement du scanner en z , pour garder la valeur de consigne (*set-point* en anglais) constante sur la photodiode, et (ii) le mode à hauteur constante, où z reste constant et on mesure la déflexion du levier.

Les forces appliquées sont comprises entre 10^{-9} et 10^{-7} N et la distance pointe/surface est inférieure à 0,5 nm. La vitesse d'acquisition est plus rapide et la résolution latérale est meilleure par rapport aux deux autres modes. Cependant, les échantillons fragiles peuvent être endommagés si la force d'appui n'est pas rigoureusement maîtrisée.

III.3.2. Mode contact intermittent (Tapping Mode™)

Ce mode consiste à faire osciller le levier à sa fréquence de résonance (~ 5 -300 kHz) à une certaine amplitude. La pointe interagit donc périodiquement avec l'échantillon. Lorsque celle-ci rentre en contact avec la surface, l'amplitude de l'oscillation décroît. La boucle d'asservissement réajuste donc la hauteur de l'échantillon pour maintenir constante l'amplitude d'oscillation.

L'échantillon risque moins de dommages avec ce mode, car le contact avec la surface n'est pas continu. Cependant, le temps d'acquisition d'une image est beaucoup plus lent qu'en mode contact.

III.3.3. Mode non-contact

Le mode non-contact, quant à lui, exploite les forces attractives s'exerçant entre la pointe du microlevier et l'échantillon. La pointe n'entre pas en contact direct avec la surface mais il oscille à une fréquence supérieure à la fréquence de résonance du levier.

Les forces appliquées sont inférieures à 10^{-12} N. La distance pointe/surface est de l'ordre de 1 à 10 nm. C'est la méthode la moins salissante pour la pointe et la surface. Cependant, la vitesse de balayage est très lente et la résolution latérale est plus faible.

III.4. La spectroscopie de force

Outre l'imagerie des structures biologiques (protéines, acides nucléiques, membranes, cellules vivantes), la mesure de forces mécaniques permet de quantifier les interactions intra- et intermoléculaires. La mesure de la résistance mécanique peut être aussi employée au niveau des membranes cellulaires, par exemple. Ces mesures de forces sont réalisées, à une position fixe, par des cycles d'approche/retrait de la surface vis-à-vis de la pointe (Figure 16).

En plus d'un champ d'application varié, la fenêtre de mesure de forces est très large, allant de l'ordre du piconewton, pour mesurer des forces entropiques, jusqu'à des valeurs de l'ordre du nanonewton, pour la rupture de liaisons covalentes.

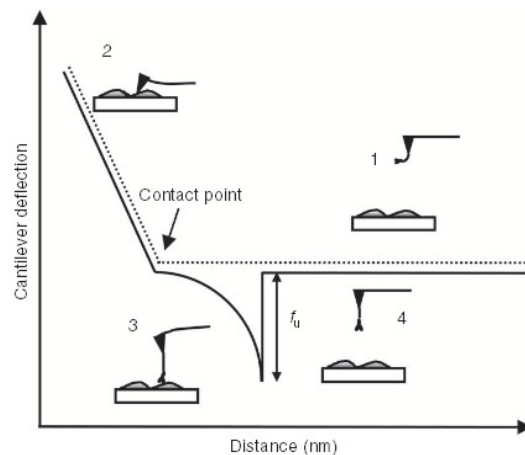


Figure 16. Principe de la spectroscopie de force

La courbe d'approche (courbe en pointillés) est caractérisée par deux zones : en (1), la pointe et la surface sont suffisamment éloignées pour qu'il n'y ait aucune interaction entre elles, la force est donc nulle. Au contact de la surface, la pointe subit une déflexion linéaire (2). A une valeur consigne de force, la pointe s'éloigne de l'échantillon (courbe continue). Elle est rythmée de plusieurs événements : d'abord une diminution linéaire identique à la courbe d'approche, jusqu'au point de contact. S'ensuit alors une zone d'adhésion entre les deux supports (échantillon et pointe), correspondant à la zone de courbure (3). Enfin, l'interaction entre l'échantillon et la pointe se rompt, à une certaine force (f_u), appelée force de rupture. Les deux entités se détachent, et la force redevient nulle (4). D'après (Puntheeranurak et al, 2011)

III.4.1. Mesure des propriétés mécaniques d'objets biologiques

Pour comprendre les mécanismes biologiques il est très important d'évaluer la réponse mécanique de tissus, cellules, membranes, protéines ou encore d'acides nucléiques à des perturbations extérieures. De plus, la plupart des systèmes biologiques montrent des propriétés mécaniques hétérogènes, à l'échelle moléculaire. L'AFM est donc l'outil le plus approprié pour effectuer ce genre de mesure. La détermination des propriétés mécaniques (élasticité, rigidité) se fait dans la phase d'approche entre la pointe et la surface. Deux types d'expérimentations peuvent être menés : (i) soit l'étude de la déformation de l'échantillon, (ii) soit l'étude de la résistance mécanique de celui-ci sous la force exercée par la pointe. Dans cette partie, ne seront détaillées que les mesures de déformation d'objets biologiques. L'étude de la résistance mécanique des membranes lipidiques fait l'objet d'un sous-chapitre entier (IV.3. Evaluation des propriétés nanomécaniques des membranes).

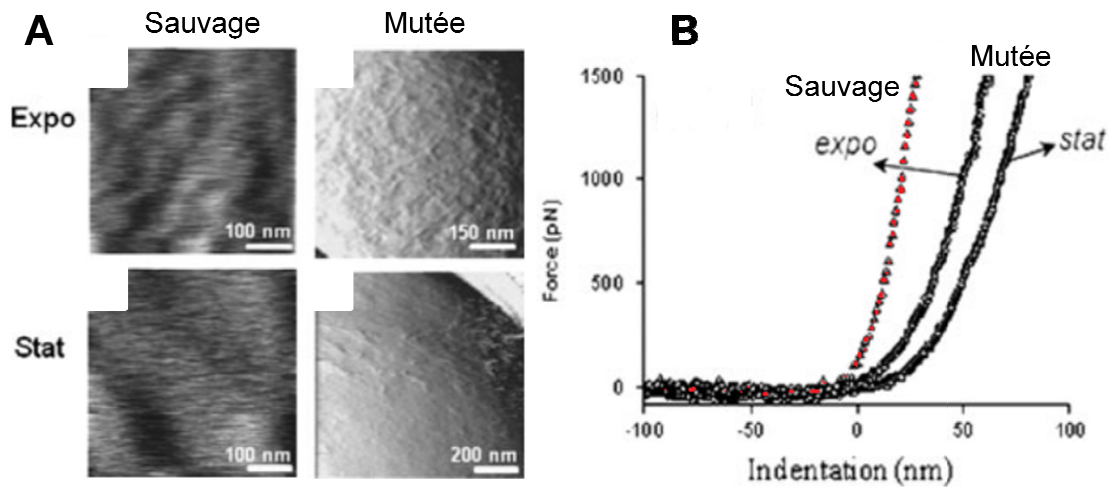


Figure 17. Mesure des différences d'élasticité de la paroi d'une levure sauvage et mutée

Les images de topographie de la paroi cellulaire sauvage et mutée en phase exponentielle (expo) de croissance et en phase stationnaire (stat) sont présentées en (A). Les mesures de déformation de la paroi cellulaires des deux souches (l'une sauvage et l'autre mutée), sont réalisées par des courbes de force-distance (B). A partir des courbes d'approches, le module d'élasticité est calculé. Ainsi, la paroi cellulaire de la souche mutée (courbes o, en blanc) serait moins élastique (module de Young plus faible) que celle de la souche sauvage (courbe Δ, en rouge). De plus, ces résultats montrent également une différence d'élasticité selon la phase de croissance (B). D'après (Dague et al, 2010)

A partir des courbes de force-distance générées, de nombreux paramètres peuvent être calculés. Par exemple, le niveau de courbure, au point de contact entre le support et la pointe (phase 2, Figure 16), permet d'évaluer l'élasticité de l'échantillon analysé : plus le rayon de courbure est grand, plus l'échantillon est déformable. A partir de ces mesures, le module de Young, traduisant le degré d'élasticité, peut être calculé. Ainsi, l'équipe de J-M François, s'est intéressée à l'altération des propriétés mécaniques d'une paroi cellulaire de levure (Dague et al, 2010), induite par des changements mutationnels de structure (Figure 17). La détermination du module de Young a donc permis, d'une part de quantifier les variations d'élasticité et, d'autre part de visualiser les changements topographiques induits par ces mutations (Figure 17 A). D'autres paramètres mécaniques peuvent être aussi déterminés grâce aux courbes de force-distance, comme la rigidité (Gaboriaud et al, 2005; Medalsy & Müller, 2013) ou encore la rugosité (Dague et al, 2010).

III.4.2. Mesure des interactions intermoléculaires

La mesure de ces interactions intermoléculaires peuvent être soit d'ordre non-spécifique, comme les forces d'adhésion support/support par exemple, soit d'ordre spécifique, comme la reconnaissance moléculaire de type récepteur/ligand. La reconnaissance moléculaire

spécifique entre deux entités est cruciale dans beaucoup de processus biologiques comme la signalisation cellulaire (fixation d'un médicament sur un récepteur couplé à une protéine G) ou bien dans la protection immunitaire (la formation du complexe antigène(Ag)/Anticorps(Ac) déclenchant la cascade de formation du complément).

La détermination des forces d'interactions entre deux molécules, par spectroscopie de force, l'une fixée à l'extrémité de la pointe et l'autre immobilisée sur la surface, se fait pendant la phase de retrait entre la pointe et l'échantillon. En effet, à une position fixe, la surface s'approche de la pointe puis, au contact de celle-ci, se retire. La déflexion du microlevier est donc tracée en fonction du déplacement du scanner piézoélectrique (Figure 16). Lorsqu'un événement de reconnaissance a lieu entre les deux molécules, l'interaction entre celles-ci est maintenue jusqu'à une certaine valeur de force (traduit par un saut sur la courbe), généralement de l'ordre de 20-250 pN.

Afin de dissocier les forces non-spécifiques des forces spécifiques, des protocoles de fonctionnalisation faisant intervenir l'utilisation de bras espaceurs se sont développés. Très rapidement, ils ont remplacé les protocoles de greffage traditionnels, consistant en une simple adsorption non-spécifique de la molécule d'intérêt sur la pointe (Ebner et al, 2007; Ebner et al, 2008). Les chaînes de poly(éthylèneglycol) (PEG) sont très fréquemment utilisées, en tant qu'espaceur, pour la fonctionnalisation des pointes (Haselgruebler et al, 1995; Kienberger et al, 2006). Outre la différenciation des pics (sauts) non-spécifiques des pics spécifiques, les avantages majeurs de ces bras PEG sont qu'ils sont chimiquement et physiquement inertes. Ils évitent également le crash de la pointe sur la surface tout en augmentant la robustesse de la fixation (grâce aux liaisons covalentes).

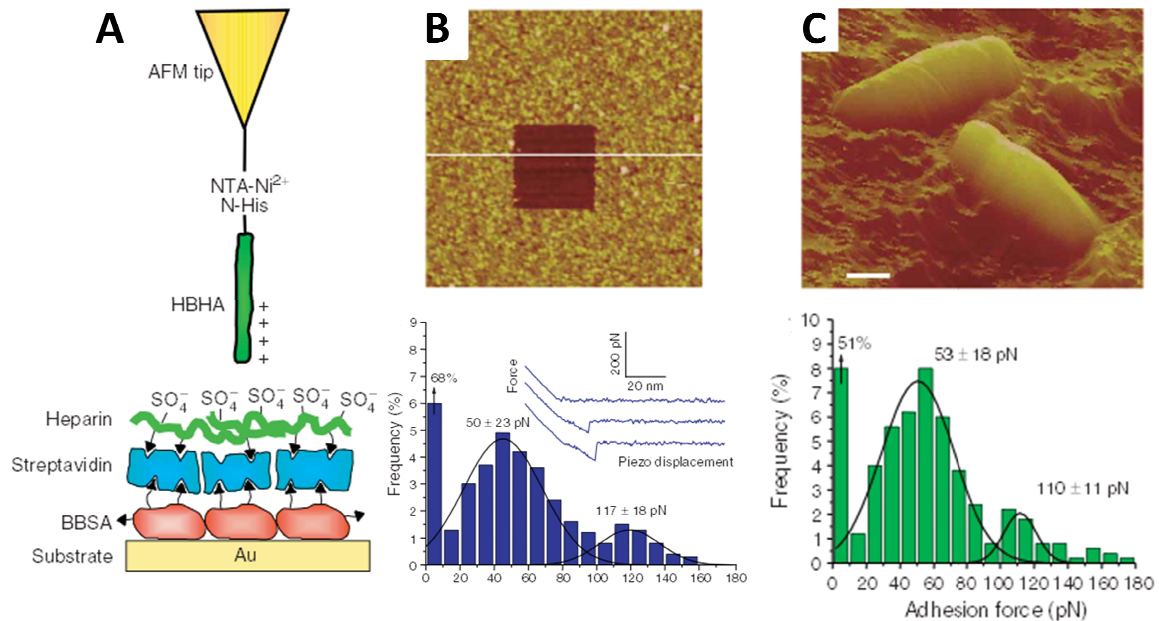


Figure 18. Mesure d'interactions intermoléculaires spécifiques de type ligand/récepteur

Mesure des interactions entre « l'heparin-binding-haemagglutinin-adhesin » (HBHA) produite par *Mycobacterium* et l'héparine. L'étude s'est concentrée, dans un premier temps, sur les molécules de HBHA et d'héparine purifiées (A). Les pointes sont fonctionnalisées avec l'HBHA. Une couche de sérum albumine bovine biotinylée (BBSA) est déposée sur une surface d'or. L'héparine biotinylée, quant à elle, est attachée au support par l'intermédiaire d'une couche de streptavidine (A). Le complexe formé sur la surface d'or est imagé par AFM (B). Les forces d'interaction enregistrées (32 % d'adhésion) suivent une distribution bimodale avec un pic majoritaire à 50 pN et un autre à 117 pN. Dans un second temps, les mesures sont réalisées directement sur *M. bovis* (C). Produite à la surface de la bactérie, l'HBHA se retrouve ainsi sur le support. L'héparine est donc greffée sur la pointe. Les forces mesurées (fréquence d'adhésion oscillant entre 4 % et 49 %) montrent aussi une distribution bimodale avec un pic majoritaire à 53 pN et un pic minoritaire à 110 pN. D'après (Dupres et al, 2005)

Dans l'exemple présenté dans la Figure 18, Dufrêne et ses collaborateurs se sont intéressés à quantifier les forces d'adhésion établies entre une bactérie pathogène mortelle et les récepteurs des cellules hôtes. Ainsi, ils ont utilisé l'AFM pour mesurer les forces spécifiques d'interaction entre *Mycobacterium tuberculosis* produisant « l'heparin-binding-haemagglutinin-adhesin » (HBHA), afin d'adhérer aux parois cellulaires de l'organisme hôte, et l'héparine, utilisée comme un récepteur modèle (Dupres et al, 2005). Les mesures d'adhésion sont tout d'abord réalisées sur molécules purifiées. Ainsi, l'HBHA est fixée covalamment à la pointe AFM alors que l'héparine, elle, est immobilisée sur la surface grâce à un protocole de fixation détaillé sur la Figure 18 A. Les mesures de forces sur molécules purifiées montrent une distribution bimodale avec un pic majoritaire à 50 pN et un autre à 117 pN (Figure 18 B). Dans un second temps, les mesures sont réalisées directement sur cellules vivantes (Figure 18 C). Les bactéries sont directement fixées sur le support ; l'héparine, elle,

est donc greffée sur la pointe. Les forces mesurées sur bactéries suivent là aussi une distribution bimodale avec un pic majoritaire à 53 pN et un pic minoritaire à 110 pN. A partir de ces résultats, les auteurs ont pu tout d'abord montrer que les forces d'adhésion mesurées étaient bien spécifiques et concordaient entre les molécules purifiées et les molécules en conditions « natives ». D'autre part, à partir des fréquences d'adhésion, ils ont pu conclure que les adhésines n'étaient pas distribuées de façon homogène sur la surface des bactéries mais étaient plutôt concentrées en microdomaines (les fréquences d'adhésion variant de 4 % à 49 %). Des mesures de forces en dynamique ont permis également de déterminer des paramètres cinétiques de l'interaction HBHA/héparine (Dupres et al, 2005). En effet, en modulant la vitesse de retrait du microlevier, des paramètres cinétiques sur la reconnaissance spécifique peuvent être déterminés. La constante cinétique de dissociation (k_{off}) et d'association (k_{on}), ainsi que la barrière énergétique⁹ (x_B), définie par la distance minimale entre les deux entités pour former une liaison, peuvent donc être calculées à partir de représentations secondaires (Hinterdorfer et al, 1996; Hinterdorfer & Dufrêne, 2006). A partir de ces paramètres, les constantes de dissociation (K_D) et d'association (K_A) peuvent être déduites.

III.4.3. Étirement de macromolécules biologiques

L'étirement de macromolécules biologiques de différentes natures (protéique, polysaccharidique, nucléique) est utilisé en spectroscopie de force afin d'étudier les interactions intramoléculaires. En effet, une molécule, ayant une conformation tridimensionnelle, peut être dépliée par étirement, et les forces associées (intramoléculaires) peuvent être déterminées sur la phase de retrait des courbes de force-distance. Brièvement, les molécules d'intérêts sont fixées sur la surface, tout en préservant leurs propriétés conformationnelles. Un microlevier non fonctionnalisé est approché de la surface. Une molécule peut alors se fixer sur la pointe, par adsorption non-spécifique, puis se déplier (perte de sa conformation tridimensionnelle) par retrait de la pointe (à condition que les forces d'adhésion à la pointe soient plus fortes que les forces intramoléculaires étudiées). Les courbes de retrait enregistrées montrent alors un motif caractéristique de pics multiples (Figure 19 C).

⁹ Ce paramètre est très difficile, voire impossible, à évaluer avec une autre méthode plus conventionnelle

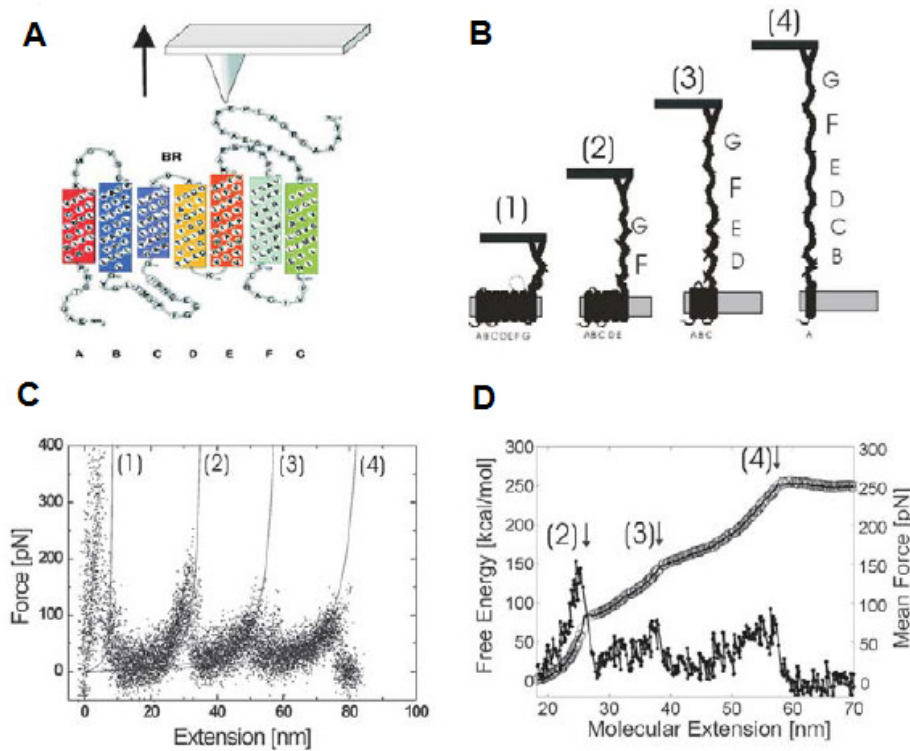


Figure 19. Dépliection d'une protéine membranaire par spectroscopie de force

La protéine membranaire étudiée est la bactériodopsine (retrouvée dans les membranes pourpres), composée de 7 hélices α transmembranaires (A). L'extraction des sous-unités se fait d'abord par paire (G-F, puis E-D, puis C-B) avant de détacher la dernière sous-unité A, de la membrane (B). Ce dépliection se traduit, en termes de courbe de force, par un motif de 4 pics (C) correspondant aux séquences d'extraction montré en (B). Le profil d'énergie libre de repliement des sous-unités peut être également tracé à partir des courbes de force-distance (D). D'après (Kienberger et al, 2005)

Dans cet exemple, les interactions intramoléculaires d'une protéine transmembranaire est étudiée par spectroscopie de force (Figure 19 A). Le dépliection successive des sous-unités de la protéine est traduit par 4 pics caractéristiques. A partir de ceux-ci, la force d'extraction de « chaque sous-unités » (G-F, E-D, C-B puis A) peut être déterminée ainsi que la longueur de l'enchainement peptidique associé (correspondant à la distance entre deux pics). Un profil d'énergie libre de repliement peut être également tracé (Figure 19 D).

Sur le même principe, de nombreux travaux se sont intéressés, par exemple, aux propriétés de dépliection/repliection de protéines (Rief et al, 1997), aux changements conformationnels des sucres cycliques (Lee et al, 2004) ou encore aux modalités d'altérations de la structure secondaire de l'ADN (Rief et al, 1999).

III.5. Avancées technologiques, couplages et nouveaux modes

III.5.1. Couplage imagerie/spectroscopie de force

Depuis son invention en 1986, l'AFM n'a cessé d'évoluer : d'une simple technique d'imagerie de surface, il est devenu, au fil des années, un outil « multipotent ». En effet, d'autres modes sont venus compléter la fonction première de l'AFM comme la spectroscopie de force. Les mesures des forces d'adhésion, tout d'abord réalisées par des cycles d'approche/retrait, se font depuis peu en cartographiant la surface, et sont enregistrées simultanément avec la topographie de la surface. Cette méthode a été développée afin de localiser les sites de fixation avec une précision à l'échelle nanométrique, difficilement détectable avec une simple image de topographie (Chitcheglova et al, 2007). Devant l'émergence de ces nouvelles combinaisons, Bruker, un des fournisseurs leader d'AFM, a commercialisé récemment, une nouvelle technologie d'AFM (Kaemmer, 2011). En effet, outre le fait d'imager et de réaliser une cartographie des forces d'adhésion, ce nouvel outil est doté d'un logiciel permettant l'automatisation des réglages (ScanAssyst).

III.5.2. Couplage AFM/microscopie optique

Les techniques d'imageries optiques, et notamment la FM, constituent un outil très puissant pour visualiser sélectivement et spécifiquement, des molécules marquées, à très haute résolution. Ces techniques rendent alors possible le suivi de processus biologiques et permettent d'observer leur dynamique, au sein de cellules vivantes, par exemple (Frankel et al, 2006; Hecht et al, 2012; Hernando et al, 2004; Peng et al, 2007).

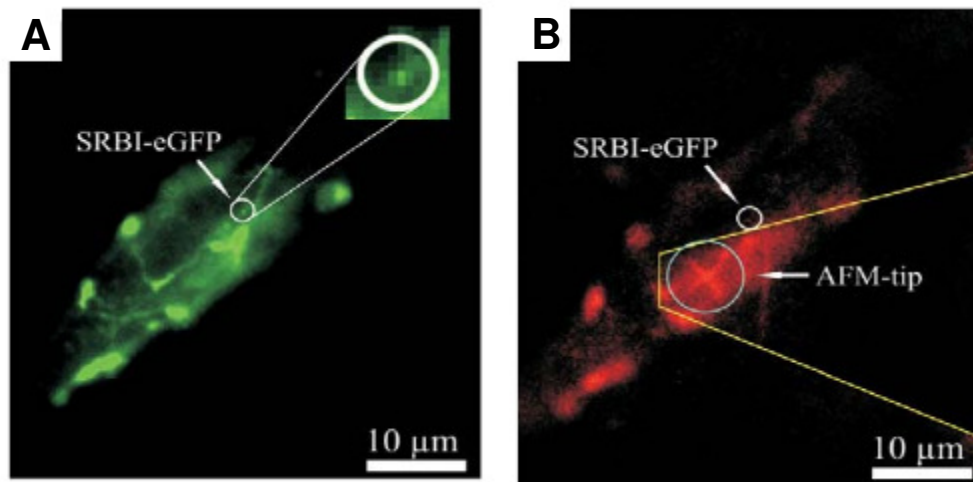


Figure 20. Combinaison AFM/FM pour l'étude de l'interaction SRB1/Anti-SRB1

Les récepteurs SRB1, marqués par la GFP, sont localisés dans un premier temps grâce à la microscopie de fluorescence (A). Puis, la luminescence de la pointe, caractérisée par sa forme en X, est utilisée pour l'aligner sur les récepteurs SRB1 (B). Après positionnement de la pointe aux dessus des récepteurs SRB1, les mesures de forces sont réalisées par AFM. D'après (Madl et al, 2006)

De plus, cette combinaison peut être très utile pour réaliser des expérimentations de spectroscopie de force, ainsi, la fluorescence permet de guider et de positionner la pointe le plus finement possible. En effet, si l'expression d'une molécule d'intérêt (par exemple un récepteur membranaire) est faible, la spectroscopie de force peut alors s'avérer très difficile à mettre en œuvre. Le couplage AFM/FM peut, dans ce cas là, s'avérer très utile. Par exemple, Madl et ses collaborateurs se sont intéressés à mesurer l'interaction entre des récepteurs SRB1 (pour Scavenger Receptor class B member 1, impliqué dans le recrutement du cholestérol), exprimés dans des cellules CHO¹⁰, et des anticorps Anti-SRB1 (Madl et al, 2006). Les récepteurs SRB1, marqués par la protéine GFP¹¹, ont été facilement localisés, par FM, sur la surface de la cellule (Figure 20 A). La pointe, fonctionnalisée avec les anticorps Anti-SRB1, peut alors être approchée de la surface. Grâce à sa luminescence (Gaiduk et al, 2005), la pointe, reconnaissable par sa forme caractéristique en X, est positionnée directement au dessus des sites de SRB1 fluorescents (Figure 20 B), et les mesures de forces sont alors réalisées. Cet exemple montre alors toutes les possibilités d'un couplage entre AFM et microscopie optique, dont la FM.

¹⁰ CHO : « Chinese Hamster Ovary » est une lignée cellulaire très utilisée dans l'expression et la production de protéines recombinantes.

¹¹ GFP : « Green Fluorescent Protein » est une petite protéine fluorescente très utilisée en tant qu'étiquette pour « marquer » une autre protéine d'intérêt.

III.5.3. Le « High Speed » AFM

Une autre avancée technologique ayant ouvert un nouveau champ d'application est, comme mentionnée dans l'historique, l'arrivée du « High Speed AFM » (HS-AFM). En effet, après son invention en 2001, par l'équipe de T. Ando, cet AFM, à la vitesse de scan extrêmement rapide (près de 10 images par seconde), permet d'imager des processus biologiques en dynamique et à très haute résolution. Par exemple, dans la Figure 12, l'utilisation du HS-AFM a permis de visualiser, pour la première fois, le processus de formation d'une SLB. Plus spectaculaire, T. Ando et ses collaborateurs ont pu observer, en 2010, le déplacement d'une tête de myosine sur un filament d'actine (Figure 21).

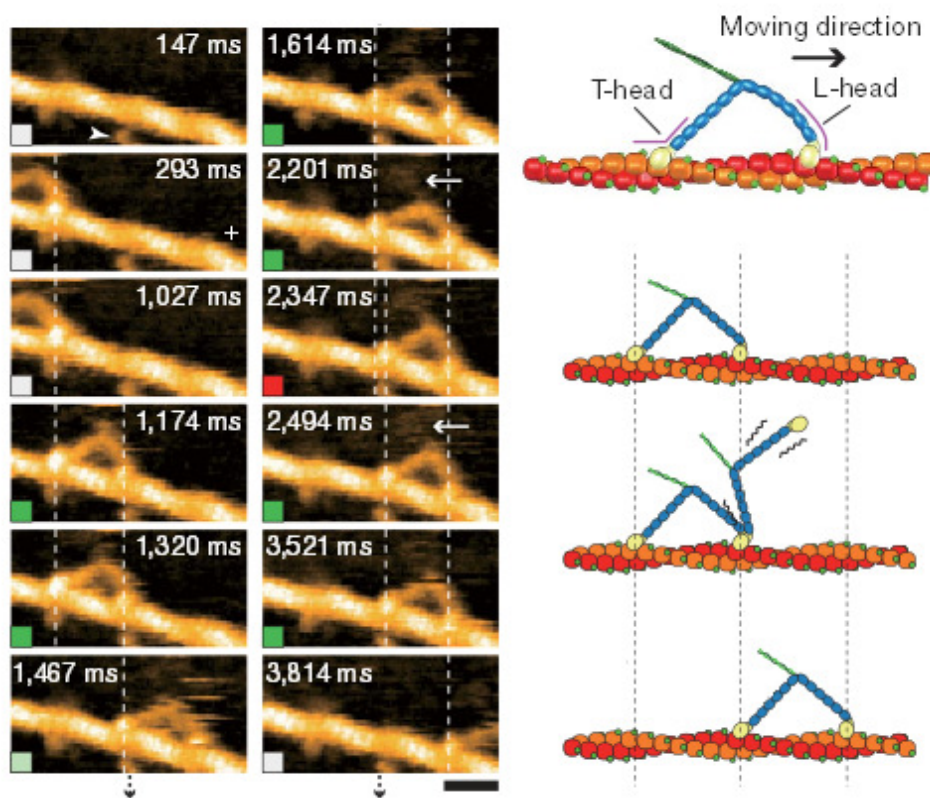


Figure 21. Visualisation par HS-AFM du déplacement d'une tête de myosine sur un filament d'actine.

Les images AFM successives, à gauche, montrent le mouvement progressif d'une tête de myosine (M5-HMM) sur un filament d'actine. La vitesse de scan est de 7 images/s sur une surface de 130×65 nm². À droite, est représenté un schéma explicatif du mécanisme visualisé à gauche. Adapté de (Kodera et al, 2010).

Le HS-AFM a permis ainsi de visualiser des changements conformationnels de molécules ou encore d'autres processus biologiques dans des conditions physiologiques et à très haute résolution spatio-temporelle (Ando, 2012).

III.5.4. Variantes de l'AFM

Enfin, d'autres variantes de l'AFM, fondées sur le même principe, utilisant des propriétés physiques de la pointe par exemple, se sont développées dans le domaine de l'électronique. Ainsi, la microscopie à force magnétique (MFM), utilisant une pointe recouverte d'un film ferromagnétique, permet d'identifier des domaines magnétiques invisibles en topographie (Kobljanskyj et al, 2012). Un autre exemple, est celui du développement du microscope à force électrostatique (EFM) qui, à l'aide d'une pointe métallisée polarisée, utilise les forces de répulsions/attractions électrostatiques pour imager les domaines chargés à la surface de l'échantillon (Datta et al, 2008).

Chapitre IV. Etude des membranes biomimétiques par AFM

Nous avons vu à travers les deux chapitres précédents, d'une part que les membranes modèles constituent un mime très intéressant et, d'autre part que l'AFM constitue un outil de choix pour l'étude d'objets biologiques, dans des conditions physiologiques, avec une très haute résolution. Ainsi, dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux divers travaux de caractérisation des biomembranes, ainsi que leur interaction avec des agents exogènes, qui ont été menés, grâce à la microscopie à force atomique.

IV.1. Etude de l'organisation des bicouches lipidiques supportées

Nous l'avons évoqué dans les chapitres précédents, l'AFM a permis de caractériser en grande partie les modèles membranaires biomimétiques. Depuis ces 20 dernières années, les travaux de recherche ont porté sur la ségrégation de phase, la nucléation et la croissance des domaines membranaires, les modalités de fusion des liposomes, ou encore la compréhension des rafts lipidiques (Morandat et al, 2013).

IV.1.1. Organisation latérale et ségrégation de phase

La ségrégation de phase peut être observée au sein de SLBs, (i) soit en visualisant des lipides à une température proche de celle de leur T_m , (ii) soit en utilisant un mélange de plusieurs lipides ayant des T_m différentes. Par exemple, Tokumasu *et al.* ont pu visualiser la transition de phase du DMPC en augmentant la température, de 17,5 à 33°C (Tokumasu et al, 2003). Ainsi, en distinguant la phase fluide de la phase gel, grâce à leur différence de hauteur de 0,49 nm, l'imagerie AFM a permis d'observer l'apparition de la phase fluide progressivement avec l'augmentation de la température. Une autre étude AFM a révélé que plusieurs transitions de phase peuvent apparaître au sein d'une bicouche composée de DPPC. En effet, l'équipe de Leonenko a tout d'abord pu visualiser une large transition de phase gel/fluide de 42°C à 52°C, avec une coexistence des phases L_β et L_α caractérisée par des hauteurs de 4,2 et 3,3 nm

respectivement (Leonenko et al, 2004). Une complète disparition des domaines gels de DPPC est observée à 52°C. En augmentant la température de 53 à 60°C, les auteurs ont pu noter l'apparition d'un autre niveau de gris (plus bas de 0,8 à 1 nm) correspondant à une autre transition au sein de la phase fluide. Cette transition apparente de 53 à 60°C est attribuée à la formation d'une phase fluide désordonnée avec interdigitation partielle des chaînes aliphatiques des lipides (Leonenko et al, 2004).

L'AFM a également contribué à mettre en évidence l'influence de certains paramètres sur la ségrégation de phase. Par exemple, la modulation du pH du tampon provoquerait une séparation de phase dans un mélange de POPC¹² /POPE¹³ 3:1 (ratio molaire), et serait dépendant de la nature des lipides utilisés (Suresh & Edwardson, 2010). Ainsi, aucune séparation de phase ne serait observée au sein d'une bicouche ne contenant que des lipides insaturés. Un autre exemple montre clairement que la nature du support joue également un rôle important sur la ségrégation de phase. Ainsi, Facci et ses collaborateurs ont montré que la ségrégation de phase au sein d'une SLB de POPE/POPG¹⁴ 3:1 (ratio molaire) est différente sur mica ou sur oxyde de silicium. En effet, la transition de phase observée, par élévation de la température, se produit toujours de manière homogène (avec les deux feuillets simultanément) sur oxyde de silicium, alors qu'elle conduit à la formation d'un niveau intermédiaire (correspondant à un découplage des deux feuillets), sur mica (Seeger et al, 2010).

Un autre moyen d'obtenir une asymétrie membranaire est de faire varier la température des SLBs préformées (Giocondi et al, 2001; Lin et al, 2006), ou d'imager celles-ci après un court temps d'équilibration (Choucair et al, 2007).

IV.1.2. Mécanisme de nucléation et croissance des domaines

L'AFM a particulièrement permis d'examiner le processus de nucléation et de croissance des domaines dans des SLBs de composition binaire voire ternaire. Ainsi, Simonsen et ses collaborateurs ont montré que la nucléation des domaines de DPPC est proportionnelle au refroidissement de la bicouche après fusion (Bernchou et al, 2009b). D'autres ont observé que

¹² POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

¹³ POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine

¹⁴ POPG : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycérol

le nombre de sites de nucléation était influencé par la nature du support (Blanchette et al, 2006).

La croissance de ces domaines, quant à elle, serait contrôlée par la diffusion des molécules de DPPC de la phase fluide à l'interface fluide/gel. Selon le régime de croissance des domaines, régi par la température, la morphologie de ceux-ci évoluerait d'une forme ronde à une forme fractale (Blanchette et al, 2008b)

IV.1.3. Modalités de fusion

Nous avons vu précédemment (chapitre II.3. Les bicouches lipidiques supportées), que la formation des SLBs dépend de plusieurs paramètres relatifs aux supports (énergie de surface, composition chimique) et au milieu (composition, pH et force ionique du tampon). Une étude originale, menée par l'équipe de Roiter, s'est intéressée aux modalités de fusion des liposomes en fonction de la rugosité du support (support nanostructuré) (Roiter et al, 2008; Roiter et al, 2009).

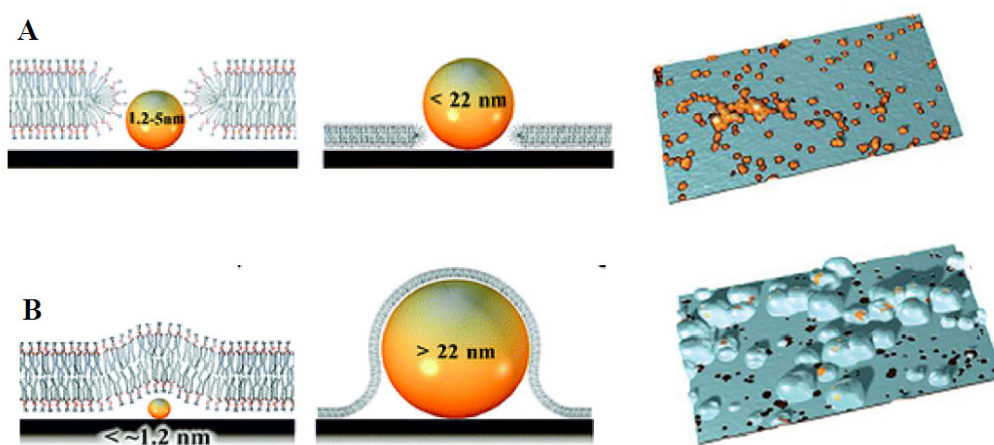


Figure 22. Formation des SLBs sur des surfaces nanostructurées ;

Les vésicules de DMPC sont déposées sur des supports de silice recouverts de nanoparticules de silice de différents diamètres. Les bicouches lipidiques peuvent former un pore autour de la nanoparticule (A) ou bien suit la topographie de la surface, recouvrant les nanoparticules (B). D'après (Roiter et al, 2008).

Les vésicules lipidiques sont ensuite fusionnées sur ces supports rugueux (formés par dépôt de NPs de silice de différents diamètres) puis les SLBs formées sont imagées à l'AFM. Les auteurs ont pu noter que, pour des diamètres de NPs compris entre 1,2 et 22 nm, les SLBs forment des pores autour des particules de silice (Figure 22). A l'inverse, lorsque le diamètre

des NPs est inférieur à 1,2 nm ou supérieur à 22 nm, les vésicules lipidiques sont capables de former une bicouche continue, recouvrant le support nanostructuré (Figure 22).

Enfin, la formation des SLBs dépend bien évidemment des lipides utilisés (composition, charge, taille des liposomes, état physique) utilisés mais aussi de la méthode employée pour générer ces SLBs (cf. Tableau 2).

IV.1.4. Organisation des rafts lipidiques dans les membranes

Depuis leur première définition en 1988, les rafts lipidiques ont été largement analysés et caractérisés grâce à l'AFM. L'utilisation d'une composition ternaire, composée de PC insaturés, de SM et de Chol, constitue un très bon mime des rafts lipidiques présents dans la membrane cellulaire (Chiantia et al, 2008; El Kirat & Morandat, 2007; Weerachayanukul et al, 2007). Ainsi, il a pu être démontré par AFM, que le taux de cholestérol influence la morphologie ainsi que la taille des domaines. De plus, d'autres travaux ont montré que des SLBs de DOPC¹⁵/SM sans Chol pouvaient présenter une asymétrie, alors que l'addition de 5-15 % de cholestérol pouvait restaurer la symétrie membranaire. Ces résultats suggèrent donc que les molécules de cholestérol seraient impliquées dans le couplage des deux feuillets membranaires (Milhiet et al, 2002; Rinia et al, 2001).

IV.2. Interaction des membranes biomimétiques avec des agents exogènes

IV.2.1. Interaction avec des peptides

L'AFM a incontestablement contribué à la compréhension des interactions entre les membranes lipidiques et les peptides comme, par exemple, les peptides antimicrobiens, les peptides amyloïdes.

Les peptides antimicrobiens (*Antimicrobial peptides* en anglais, AMPs) constituent une classe importante qui sont capables de déstabiliser les membranes des microorganismes. Dans un travail pionnier, Mou et ses collaborateurs ont étudié le comportement de la gramicidine (gA), un AMP formant des pores dans les membranes (Mou et al, 1996). Ils ont pu observer que la

¹⁵ DOPC : 1,2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

gA, à faible concentration, s'insère dans les domaines très ordonnés de DPPC, formant des agrégats très fins, « linéaires ». A partir de 2 % (molaire), la gA s'organise en domaines structurés, formant une structure hélicoïdale (Figure 23). Au delà de 10 % (molaire) de gA, la morphologie de la bicouche est complètement perturbée.

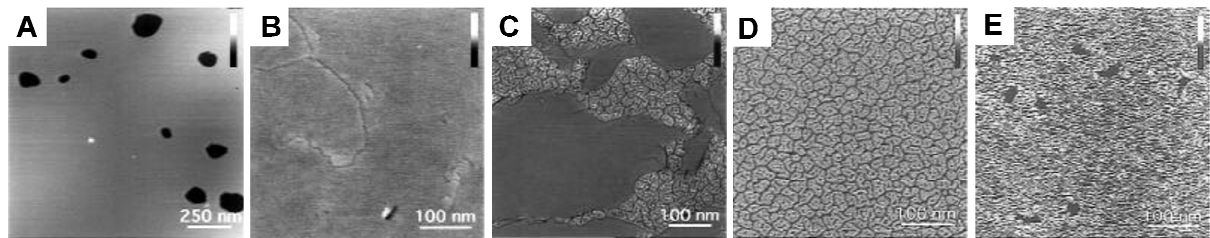


Figure 23. Interaction de la gramicidine A (gA) avec une SLB de DPPC

Une bicouche de DPPC sans gA est d'abord imagée (A) par AFM. Lorsque 1 % (molaire) est mélangé aux lipides, la gA s'organise « en ligne » dans la phase gel de DPPC (B). A 2 % (molaire) la gA s'organise en domaines structurés (C) jusqu'à être totalement connectés (D) à 5 % (molaire). A 10 % (molaire), les domaines de gA ne sont plus définis et la membrane présente beaucoup de défauts (E). D'après (Mou et al, 1996)

Depuis peu, les travaux portant sur les interactions peptides/membranes se font de plus en plus avec une approche multitechnique, impliquant la caractérisation par AFM. Ainsi, une étude récente sur l'interaction de deux orthologues de la famille des cathélicidines a montré que les deux peptides se comportaient très différemment vis-à-vis de la membrane lipidique. En effet, un des deux peptides provoquerait une perméabilisation membranaire, alors que l'autre agirait plutôt en formant des défauts bien définis (Morgera et al, 2009).

Parmi les peptides naturels, ceux formant des fibrilles amyloïdes ont énormément attiré l'attention des scientifiques pour leur implication dans la maladie d'Alzheimer, le diabète de type 2, ou encore l'encéphalopathie spongiforme bovine dite « maladie de la vache folle » (Sipe & Cohen, 2000). La maladie d'Alzheimer est une maladie héréditaire provoquée par des mutations du peptide β amyloïde ($A\beta$). Récemment, Pifer *et al.* ont étudié l'impact des mutations sur l'agrégation du $A\beta$ au sein d'une SLB (formée par extraction des lipides du cerveau) (Pifer et al, 2011). Les images AFM ont montré que les mutants du $A\beta$ forment des agrégats de différentes morphologies des fibrilles allongées, des structures très courbées (agrégats en forme d'anneau), ou encore des fibrilles très ramifiées. Dans un autre travail, l'influence du ganglioside GM1, présent dans les membranes du cerveau (Mao et al, 2010) a été étudiée sur des SLBs composées d'un mélange SM/Chol/GM1. Toujours grâce à une approche multitechnique, les auteurs ont pu ainsi démontrer que le GM1 accélérât la

formation d'oligomères et de fibrilles de A β toxiques, responsables de la destruction des neurones dans la maladie d'Alzheimer.

IV.2.2. Interaction avec des protéines

Les protéines les plus étudiées dans les interactions avec les biomembranes sont les enzymes. Parmi elles, les phospholipases constituent une classe importante d'enzymes interagissant avec les membranes. En effet, leurs produits d'hydrolyse peuvent être des médiateurs lipidiques ou encore des seconds messagers (comme l'acide arachidonique, les phosphatidates ou les diacylglycérols) jouant un rôle clé dans la transduction du signal, la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose. Impliquées dans les maladies métaboliques, ces enzymes constituent, par conséquent, des cibles d'intérêt pour le développement d'inhibiteurs sélectifs dans l'industrie pharmaceutique. Divers travaux, utilisant l'AFM, ont donc étudié la digestion des bicouches par la phospholipase A₂ (PLA₂). Cette enzyme clive les phospholipides en position *sn*-2 du squelette de glycérol (voir Figure 2), libérant ainsi les lysophospholipides correspondants et des acides gras. Par exemple, des études ont montré que la PLA₂ était préférentiellement active sur les bords des défauts générés dans la bicouche (Grandbois et al, 1998; Wu et al, 2012). D'autres travaux, plus détaillées, ont mis en évidence qu'un temps de latence était généralement observé avant l'hydrolyse de la bicouche lipidique (Balashev et al, 2011; Nielsen et al, 2002). De plus, des auteurs ont rapporté que l'hydrolyse d'une double bicouche de DMPC en phase ripple (L β ') est plus importante que sur une simple bicouche en phase gel. En effet, la courbure de la membrane provoquée par les ripples favoriserait son hydrolyse par la PLA₂ (Leidy et al, 2004). L'AFM a également révélé la stéréosélectivité de l'enzyme en utilisant des SLBs formées d'énantiomères de DPPC (Moraille & Badia, 2005).

Tout comme la PLA₂, d'autres d'investigations sur les phospholipases C et D (El Kirat et al, 2004; Wagner & Brezesinski, 2007) ont aussi été menées par caractérisation AFM.

IV.2.3. Interaction avec des médicaments

Les médicaments peuvent moduler la structure ainsi que les propriétés des biomembranes ce qui peut expliquer les changements de leur cytotoxicité/activité d'un point de vue pharmacologique. Dans ce contexte, la caractérisation des interactions médicaments/membranes peut être particulièrement intéressante. Ainsi, l'AFM combinée à d'autres techniques biophysiques a permis de mettre en évidence l'interaction de deux

antibiotiques (ATBs) de la famille des fluoroquinolones (ciprofloxacine et moxifloxacine) avec des bicouches de DPPC (Bensikaddour et al, 2008). Les images AFM montrent que, sous l'effet des ATBs, les domaines apparaissent érodés, avec un effet plus prononcé avec le moxifloxacine. Son activité supérieure serait due à sa capacité à diminuer le taux de chaînes en conformation *trans-trans* de la DPPC sans en changer leur inclinaison.

D'autres études AFM, ont révélé comment les ATBs interagissent avec les SLBs. Par exemple, l'AFM a été utilisée pour examiner l'interaction de l'oritavancine, un nouvel ATB lipoglycopeptidique semi-synthétique, avec des membranes de différentes compositions (POPE, POPE/CL¹⁶ ou lipides extraits de la membrane de *S. aureus*). Ce dérivé de la vancomycine provoque une légère érosion des bords ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de la bicouche de POPE pure. Par contre, pour le mélange POPE/CL, l'ATB cause une restructuration des domaines ainsi qu'un amincissement de la bicouche de l'ordre de 0,5 nm. Enfin, avec les SLBs préparées à partir des lipides extraits de *S. aureus*, l'oritavancine forme des trous, érode les bords, et réduit l'épaisseur de la membrane de 2,2 nm (Domenech et al, 2010; Domenech et al, 2009). Comparé à la vancomycine, ce dérivé semble avoir des effets plus déstabilisants sur les membranes de *S. aureus*, ce qui peut être très intéressant pour pallier aux résistances développées par ces bactéries.

IV.2.4. Interaction avec des nanoparticules

Les scientifiques ont depuis peu exploité les outils issus de l'émergence des nanotechnologies pour imaginer des matériaux, organiques ou non, à l'échelle supramoléculaire. Ces nanomatériaux, dont les nanoparticules (NPs) font partie, ont maintenant un fort impact dans les secteurs industriels des biotechnologies, de la construction, ou encore de l'énergie (Lahmani et al, 2006). Comme évoqué dans le premier chapitre, les NPs ont aussi été proposées pour la distribution de médicaments (par l'intermédiaire de vésicules lipidiques par exemple) ou bien pour l'imagerie médicale (NPs métalliques) (Riehemann et al, 2009). Des rapports récents suggèrent que l'association des NPs avec des biomolécules pourrait influencer leur propriétés toxicologiques (Nel et al, 2009).

D'autres NPs organiques, comme les dendrimères, ont un fort potentiel dans le domaine du biomédical (Boas & Heegaard, 2004; Gillies & Frechet, 2005). Par exemple, ces polymères

¹⁶ CL : cardiolipine

dendritiques peuvent encapsuler des médicaments puis les libérer au niveau d'une cible spécifique par modulation des conditions physico-chimiques.

Parmi cette famille de NPs, les dendrimères de poly(amidoamine) (PAMAM) sont les plus connus. Plusieurs générations de PAMAM peuvent être synthétisées, chacune étant caractérisée par leur degré de ramification. Ces différentes molécules peuvent alors avoir des propriétés différentes (solubilité, stabilité thermique...). Par exemple, des études utilisant l'AFM ont révélé que les dendrimères de forte génération (G5 et G7) induisent la formation ainsi que l'extension de défauts dans la membrane. A l'inverse, les dendrimères de faible génération (G3) ne forment pas de trous mais élargissent ceux préexistants (Hong et al, 2004; Leroueil et al, 2008). A partir de ces résultats, les auteurs ont conclu que les dendrimères étaient capables de prélever des lipides de la SLB, conduisant à la perforation de la membrane. D'autres auteurs ont pu quantifier le taux de lipides « détachés » de la surface de la SLB (Parimi et al, 2008).

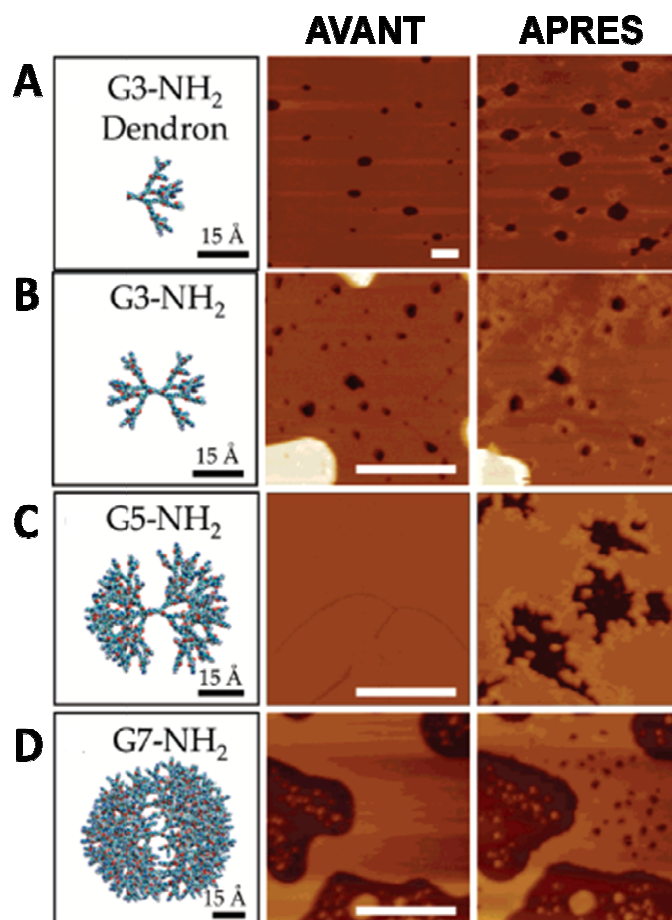


Figure 24. Interaction de dendrimères de plusieurs générations avec une SLB

Le dendron (A) ainsi que le dendrimère associé G3-NH₂ (B) s'accumulent au niveau des défauts existants au sein de la membrane, alors que les dendrimères G5-NH₂ (C) et G7-NH₂ (D) induisent la formation de nouveau défauts dans la membrane. Barre d'échelle de 500 nm. D'après (Leroueil et al, 2008).

L'AM a donc été d'un grand intérêt pour la conception de ces dendrimères dans l'optique de développer des applications pharmaceutiques spécifiques comme la vectorisation de médicament ou encore la conception d'agents de transfection.

IV.3. Evaluation des propriétés nanomécaniques des membranes

IV.3.1. Caractérisation mécanique des SLBs

Les propriétés nanomécaniques des SLBs peuvent être mesurées par spectroscopie de force comme évoqué dans le chapitre précédent (

III.4.1. Mesure des propriétés mécaniques d'objets biologiques). En effet, la surface est approchée de la pointe, augmentant ainsi la force appliquée sur la membrane. La membrane est donc progressivement compressée jusqu'à ce qu'elle soit transpercée par la pointe. Cette pénétration se traduit par un saut au niveau de la courbe de force (Figure 25). A partir de ces résultats, en utilisant la courbe d'approche, la force de rupture ainsi que l'épaisseur de la membrane peuvent être déterminées.

Beaucoup de travaux se sont intéressés à évaluer l'influence de certains paramètres sur la résistance des SLBs. Ainsi, il apparaît que les propriétés nanomécaniques des membranes lipidiques dépendent de la chimie de surface des pointes AFM utilisées (Schneider et al, 2003) ainsi que le type de support (Tableau 3). En effet, Canale et ses collaborateurs (Canale et al, 2010; Dante et al, 2011) ont comparé la résistance mécanique de SLBs fusionnées sur un support solide et sur un coussin de polymère. D'après les auteurs, les membranes préparées sur le premier type de support (mica) ont des forces de résistance qui suivent une distribution unimodale (centrée à 3,5 nN) et celles fusionnées sur le coussin de polymère, une distribution bimodale (centrée à 2,3 et 6,0 nN). Les modifications chimiques des pointes AFM peuvent être très utiles afin d'éviter les diverses pollutions pendant les expérimentations. En effet, à cause des cycles répétés de « punches » la pointe AFM peut alors se recouvrir de lipides et biaiser les mesures effectuées. Les courbes de forces peuvent alors présenter deux événements de rupture, une indentation de la bicouche présente à l'extrémité de la pointe et une indentation de la SLB (Garcia-Manyes et al, 2005a; Pera et al, 2004; Richter & Brisson, 2003). Cependant, ce problème peut être facilement résolu en utilisant des pointes AFM modifiées, terminées par des fonctions hydrophiles (Dufrene et al, 1999; Schneider et al, 2003).

D'autres travaux ont montré l'influence des conditions physico-chimiques sur la stabilité mécanique des bicouches, comme la force ionique du tampon ou encore la température.

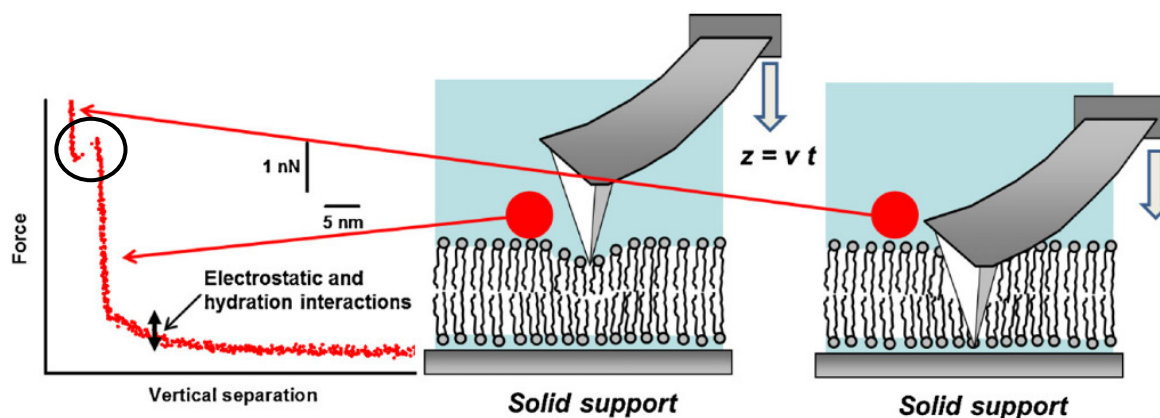


Figure 25. Représentation d'une courbe d'indentation d'une SLB.

La surface s'approche de la pointe à une vitesse constante. Après une première phase d'interaction (électrostatiques, d'hydratation), la pointe rentre en contact avec la bicouche. Celle-ci se déforme par compression entre la pointe et le support (déformation élastique) avant d'être percée (déformation plastique) par la pointe qui rentre alors en contact direct avec le support. Cette rupture se caractérise par un saut (partie encerclée). D'après (Alessandrini & Facci, 2012)

En effet, les courbes d'indentation ont montré une augmentation de la résistance mécanique de bicouches de DMPC de 2,8 nN à 0 mM de NaCl à 8,0 nN à 100 mM de NaCl (Garcia-Manyes et al, 2005a). De même, les forces de rupture des membranes diminuent logiquement avec l'augmentation de la température (Garcia-Manyes et al, 2005b). La nature des lipides (têtes polaires et chaînes hydrophobes) peut également affecter très fortement la résistance mécanique des membranes. Une étude très complète, menée par l'équipe de Garcia-Manyes, a évalué l'influence de la nature de la tête polaire, de la longueur des chaînes aliphatiques, leur degré de ramification, leur nombre d'insaturation, ainsi que l'influence du taux de cholestérol sur les propriétés mécaniques des membranes lipidiques (Garcia-Manyes et al, 2010). Ainsi, la large gamme des forces de résistance, de 3 nN pour le DPPA¹⁷ à 66 nN pour le DPPG¹⁸ illustre bien la forte influence de la tête polaire des lipides (Figure 26 B). Concernant la longueur de la chaîne hydrophobe des lipides, l'ajout d'un groupement -CH₂- augmente la résistance mécanique de 3,3 nN (Figure 26 A et A'). Comme attendu, la ramification des chaînes ou encore la présence d'insaturations provoque une diminution de la force nécessaire pour percer la membrane lipidique. Enfin, les auteurs ont démontré que l'addition de Chol quel que soit l'état de phase, augmente leur résistance mécanique linéairement avec le pourcentage de Chol (augmentation de 0,62 nN/% Chol pour la DPPC : Figure 26 C).

¹⁷ DPPA : acide 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidique

¹⁸ DPPG : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol

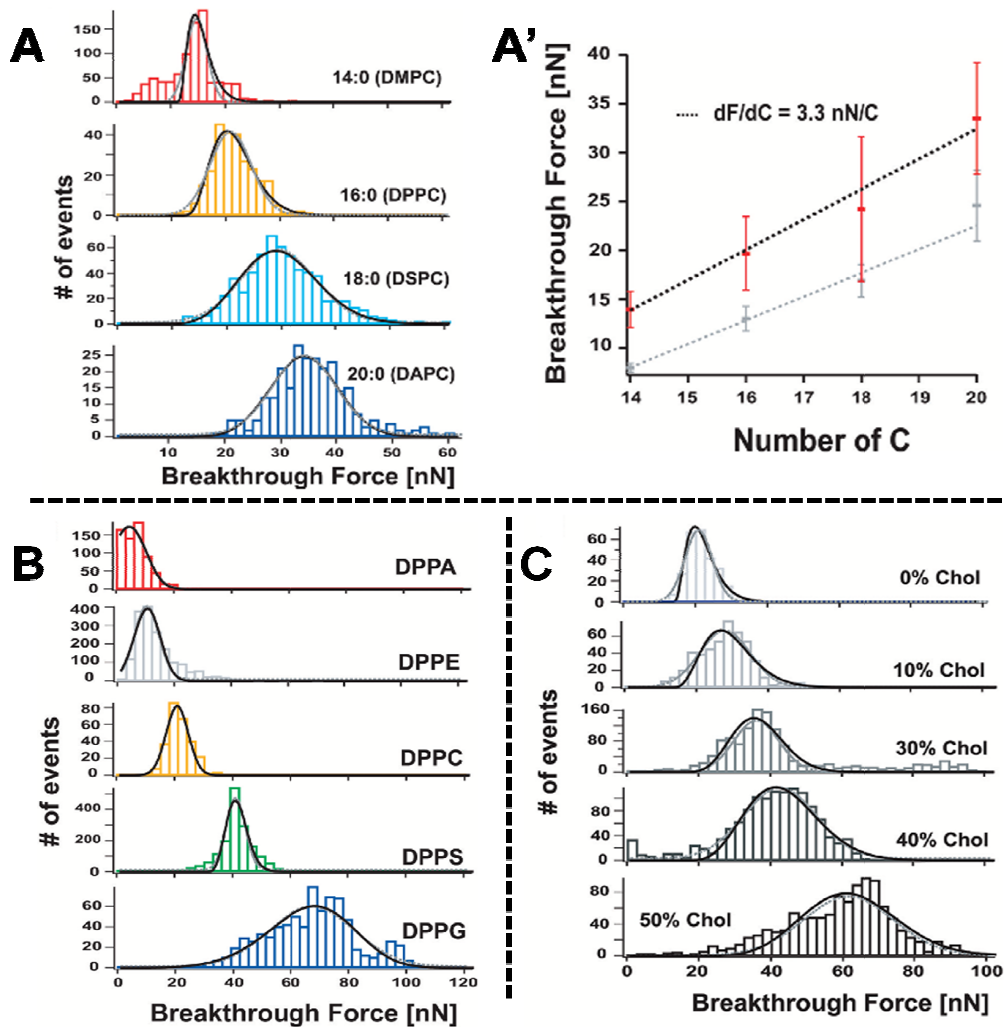


Figure 26. Evaluation de la résistance mécanique de bicouches lipidiques.

La résistance mécanique de la membrane dépend de la longueur des chaînes aliphatiques des phospholipides, de la nature de la tête polaire ainsi que du taux de cholestérol. Les histogrammes de distribution des forces de rupture de phosphatidylcholine (PC) avec différentes longueurs de queues hydrophobes sont présentés en (A). La force de rupture est proportionnelle aux nombres de carbones présents dans les chaînes aliphatiques (A'). En (B) sont représentés les histogrammes de distribution des forces de rupture de dipalmitoyl phospholipides (DP) avec différentes têtes polaires (B). L'influence du taux de Chol sur la résistance mécanique des membranes est présentée en (C). D'après (Garcia-Manyes et al, 2010)

La résolution latérale de l'AFM a permis non seulement de dissocier les propriétés mécaniques de différentes phases mais aussi de détecter les hétérogénéités existant au sein d'une même phase. Ainsi, Nussio et ses collaborateurs ont pu démontré que la résistance mécanique au sein de domaines de DPPC et de DMPC était significativement plus faible sur les bords, qu'au centre de ceux-ci (Nussio et al, 2009).

IV.3.2. Modification des propriétés mécaniques des SLBs par des agents exogènes

L'interaction des SLBs avec des agents exogènes peut provoquer des modifications qui peuvent ne pas être visibles sur les images de topographie. Dans ces cas là, la cartographie des indentations peut révéler des sites d'interaction entre l'agent exogène considéré et la membrane. Par exemple, des modifications membranaires induites par le cytochrome *c* (cyt *c*), protéine provenant de la chaîne respiratoire des mitochondries, ont pu être déterminées en utilisant cette méthode. Ainsi, les mesures de forces ont révélé que la résistance mécanique d'une membrane de DOPG¹⁹ était réduite de 45 % en présence de cyt *c* bien que les images de topographie ne montrent aucune modification (Choi & Dimitriadis, 2004). Ceci suggère donc que les molécules de cyt *c* s'insèreraient dans la membrane lipidique au niveau du cœur hydrophobe.

Une toute autre étude s'est intéressée à examiner l'effet des récepteurs SNAREs (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor* en anglais) sur le processus de fusion de deux membranes de PC (Abdulreda et al, 2008; Abdulreda et al, 2009). Ces mesures ont été effectuées grâce à la réalisation de membranes flottantes (Figure 27). Des mesures en dynamique ont permis de déterminer la barrière énergétique gouvernant le processus de fusion membranaire en absence et en présence de SNAREs. La présence de SNAREs dans les deux bicouches flottantes a montré une baisse de la valeur de la barrière énergétique traduisant donc une fusion membranaire facilitée par la présence de ces récepteurs.

¹⁹ DOPG : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylglycérol

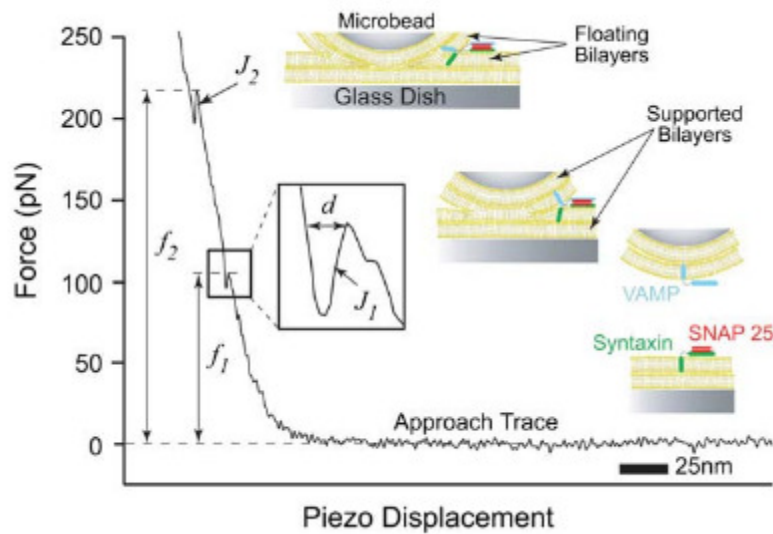


Figure 27. Mesure des forces nécessaires pour fusionner deux bicouches flottantes de PC en présence de SNAREs.

Les deux bicouches flottantes, contenant les SNAREs sont rapprochées puis compressées l'une contre l'autre. Elles finissent par fusionner en deux temps, d'abord les deux feuillets distaux, J_1 (hémifusion), puis les deux feuillets proximaux, J_2 , (fusion totale). L'encart représente un grossissement de la courbe d'approche tracée pendant la phase de « fusion ». La distance d exprime l'épaisseur d'une bicouche de PC. D'après (Abdulreda et al, 2008)

A travers ces deux exemples très différents, nous pouvons nous apercevoir de la diversité des champs d'application de la spectroscopie de force aussi bien en termes d'agents exogènes qu'en termes de méthodologies.

Chapitre V. Agents exogènes choisis dans ce travail

Nous l'avons vu au travers des chapitres précédents, le rôle de barrière biologique des membranes cellulaires, instaurant également une plateforme d'échange entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de la cellule. Celles-ci constituent alors un support fondamental pour le criblage de molécules thérapeutiques. En effet, les membranes biologiques peuvent être impliquées dans certaines maladies comme la maladie d'Alzheimer (Mason et al, 1992), la sclérose en plaque (Toshniwal & Zarling, 1992) ou encore le paludisme (Hoang et al, 2010b). Pour la plupart de ces pathologies, les mécanismes d'action au niveau moléculaire sont encore peu connus. La compréhension, ainsi que l'élucidation des processus impliqués dans ces maladies, est un challenge pour le développement de nouvelles voies/cibles thérapeutiques. Les membranes peuvent également être utilisées pour étudier les phénomènes de toxicité. En effet, les membranes biologiques sont de plus en plus sujettes à l'exposition massive de produits synthétiques issus notamment des nouvelles technologies, pouvant être particulièrement nocifs pour les cellules. Ainsi, la compréhension des interactions entre ces produits et les membranes des cellules pourraient éclairer et compléter ces études de cytotoxicité.

V.1. Implication des membranes dans certaines maladies : le cas du paludisme

Le paludisme est une maladie infectieuse parasitaire touchant les pays les plus pauvres (Afrique, Asie du Sud-Est, et Amérique centrale). Environ 3,3 milliards de personnes dans le monde, soit la moitié de la population mondiale, sont exposées au risque de paludisme²⁰. Malgré un renforcement de la prévention ainsi que des mesures de lutte qui ont permis de faire baisser les taux de mortalité de 25 % depuis l'an 2000, 216 millions de cas ont été enregistrés en 2010 et quelques 660 000 décès dus à cette maladie ont été recensés (principalement des enfants de moins de 5 ans)²⁰. Pourtant, les dix dernières années ont été marquées par une expansion considérable des moyens financiers, estimés à 1,84 milliard de

dollars en 2012²⁰. La difficulté à enrayer cette maladie est principalement due aux résistances développées par les parasites aux traitements antipaludiques classiques, ainsi qu'à une plus grande mobilité des populations.

Certaines étapes du cycle de développement du parasite demeurent encore obscures. Ainsi l'élucidation, ou tout du moins, une meilleure compréhension des processus utilisés par le parasite sont des points clés pour le développement de nouvelles molécules antipaludiques palliant ainsi les résistances établies.

V.1.1. Cycle de développement du parasite

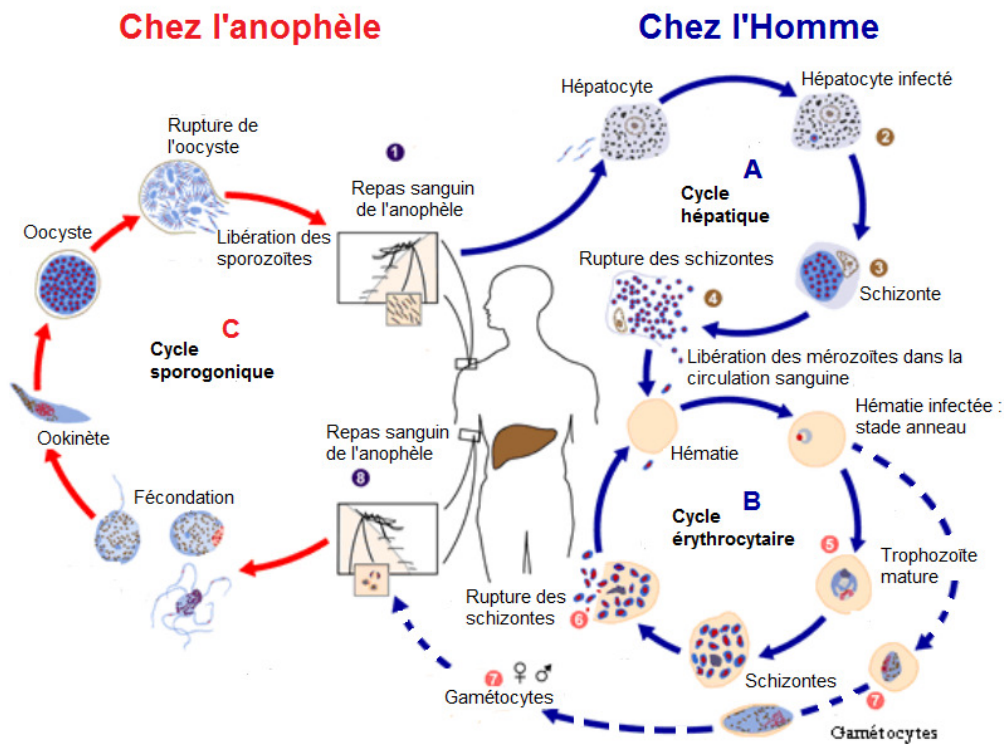


Figure 28. Cycle de développement du parasite du genre *Plasmodium* chez l'Homme (A et B) et chez l'anophèle (C)²¹

Durant son repas sanguin, l'anophèle injecte le parasite ①, sous forme de sporozoïtes, à l'Homme. Ceux-ci vont alors infecter les cellules hépatiques ②, puis subir une suite de multiplications asexuées ③, avant de libérer des milliers de mérozoïtes par lyse des cellules hépatiques infectées ④ (A : cycle hépatique). Les mérozoïtes vont alors infecter les hématies et entamer un nouveau cycle de divisions asexuées (B : cycle érythrocytaire) : d'abord le stade anneau, le stade trophozoïte ⑤ et enfin le stade schizonte ⑥. Après rupture des membranes érythrocytaires, les mérozoïtes libérés réinfectent d'autres hématies. Certains parasites se différencient en gamétocytes mâles et femelles ⑦ qui poursuivent leur développement dans l'estomac de l'anophèle lors d'un autre repas sanguin ⑧.

²⁰ Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2012 sur le paludisme dans le monde. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf

²¹ Schéma adapté du site « Centers for Diseases control and Prevention » (CDC). <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>

Le parasite responsable de la maladie, du genre *Plasmodium*, est transmis à l'Homme par l'intermédiaire de moustiques femelles (anophèles) au cours de leur repas sanguin (Figure 28). Les anophèles, peuvent donc régurgiter plusieurs dizaines de sporozoïtes qui atteignent rapidement le foie par la circulation sanguine. S'ensuit alors une suite de divisions asexuées (Figure 28 A). A l'issue de ces multiplications relativement longues (7 à 10 jours), des milliers mérozoïtes sont libérés, après la lyse de la membrane des hépatocytes, et rejoignent la circulation sanguine pour infecter les hématies. L'infection des cellules sanguines (Figure 28 B) est rythmée par différents stades :

- le stade anneau (~ 24 h) : l'entrée du parasite dans l'hématie, après reconnaissance spécifique et fixation irréversible, se traduit par une invagination de la membrane érythrocytaire au fur et à mesure de la progression du parasite dans la cellule hôte. Cette invagination conduit à la formation progressive d'une double membrane (Figure 29) : celle d'origine parasitaire et celle d'origine érythrocytaire (vacuole parasitophore, VP). Une fois entré dans l'hématie, le parasite se sert du cytoplasme érythrocytaire, emprisonné lors de son passage, pour se développer et commencer à élaborer un réseau tubulo-vésiculaire (RTV) (Haldar et al, 2002).
- le stade trophozoïte (~ 12 h) : l'évolution en stade trophozoïte est marquée par la digestion massive de l'hémoglobine (Hb) et la biosynthèse de macromolécules. Le RTV se développe et se complexifie, menant à un taux en phospholipides de 6 fois supérieur à la quantité habituelle mesurée dans les hématies (Palacpac et al, 2004). A ce stade, la vacuole digestive (VD) apparaît ponctuant le début de la digestion de l'Hb (Figure 29). Après hydrolyse des acides aminés (nécessaire à la synthèse de protéines) et l'hémine (partie ferrique)²². Molécule toxique, l'hémine, sera biocristallisée sous forme d'un cristal inerte : l'hémozoïne (Hz).
- le stade schizonte (~ 12 h) : le parasite passe à la synthèse et à l'assemblage des composants du mérozoïte. Accompagné de la biogenèse des organites des futurs mérozoïtes, le noyau subit 4 cycles de divisions conduisant à la formation de 16 noyaux de mérozoïte. Les mérozoïtes infectieux ainsi formés, sont libérés par rupture de la membrane érythrocytaire. Le corps résiduel de la VD chargée de cristaux d'Hz est lesté également à l'extérieur.

²² Toute cette partie sera plus détaillée par la suite.

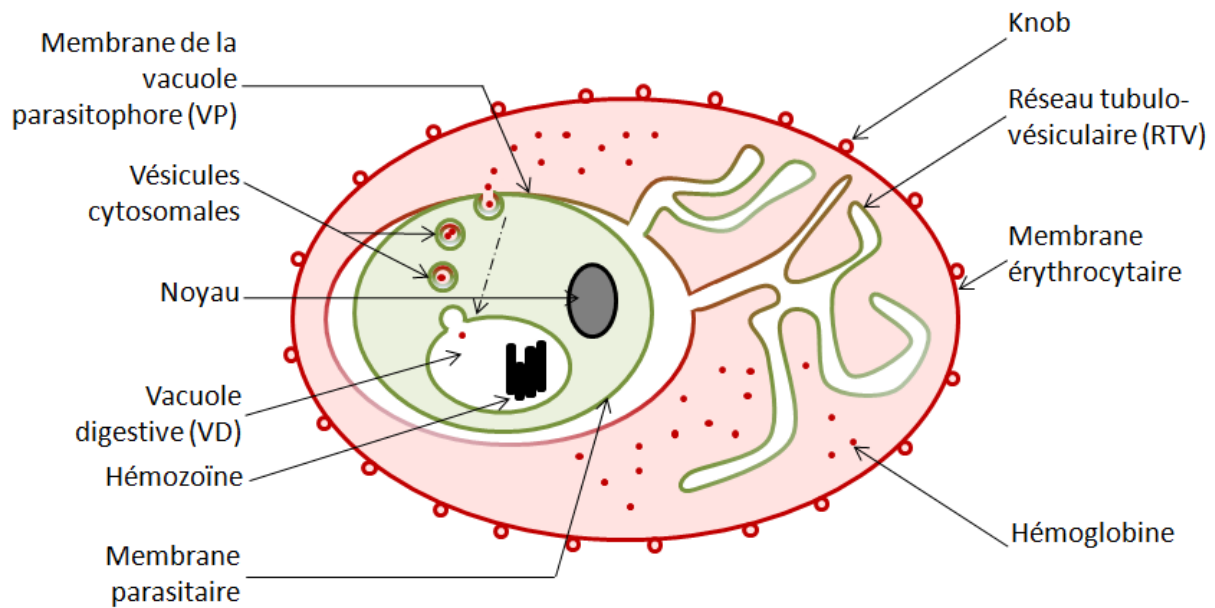


Figure 29. Schéma d'un érythrocyte infecté par le parasite *Plasmodium falciparum*

Au cours du cycle érythrocytaire, certains parasites se différencient en gamétocytes mâles et femelles qui pourront être par la suite ingérés par un autre anophèle non porteur (également lors d'un repas sanguin). L'anophèle contaminé constituera alors un vecteur supplémentaire de la maladie pouvant infecter d'autres personnes.

V.1.2. Implication des structures membranaires dans le cycle de développement du parasite

Nous venons de le voir, pendant le cycle érythrocytaire, le parasite met en place un grand nombre de processus originaux avec notamment, l'élaboration d'un véritable réseau vésiculaire et membranaire facilitant le trafic des protéines, et des lipides (Figure 29). Indispensable au développement du parasite dans la cellule hôte, il pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante, en tant qu'alternative des voies classiques.

V.1.2.1. La membrane plasmique érythrocytaire

Les membranes plasmiques des hématies infectées présentent des sillons/protrusions à leur surface (Figure 30). Ces structures, visibles aux stades trophozoïte et schizonte, sont caractéristiques de chaque espèce parasitaire (Nagao et al, 2008; Nagao et al, 2000). En ce qui concerne l'infection à *P. falciparum* (espèce la plus virulente chez l'Homme), ces protubérances, appelées « knobs », mesurent 83 nm de large et 22 nm de hauteur. Elles

joueraient un rôle crucial dans la séquestration des hématies infectées au niveau des capillaires périphériques ou dans certains organes comme le foie, la rate ou encore les poumons (Sherman et al, 2003).

Outre les changements morphologiques, la composition lipidique des membranes érythrocytaires évoluent également. En effet, la quantification des différents lipides composant la membrane érythrocytaire avant et après montre une diminution de moitié en SM (de 28 à 14 %) et une augmentation en PC de l'ordre de 7 %.(Hsiao et al, 1991).

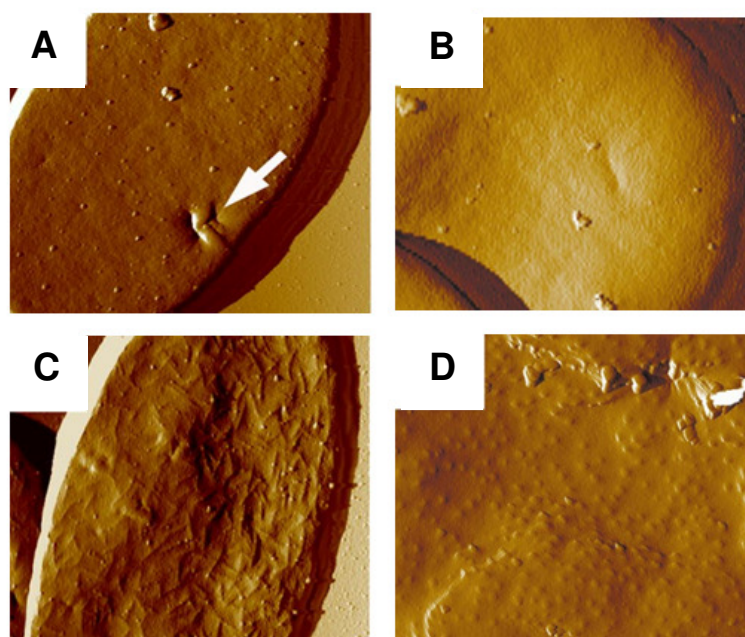


Figure 30. Changements morphologiques de la membrane érythrocytaire après infection par le parasite *Plasmodium*

Les membranes érythrocytaires sont observées par AFM. Les images des hématies, juste après infection (A et B), montrent une surface membranaire lisse. 24 heures au moins après l'infection (au stade trophozoïte), les hématies infectées par *Plasmodium gallinaceum* dévoile à leurs surfaces des sillons membranaires caractéristiques (C). L'infection par *Plasmodium falciparum* provoque la formation de protubérances à la surface des membranes érythrocytaires (D) appelées « Knobs ». D'après (Nagao et al, 2008; Nagao et al, 2000).

V.1.2.2. La membrane de la VP

Formée par l'invagination de la membrane érythrocytaire, la membrane de la VP contient donc du matériel d'origine érythrocytaire et parasitaire (Figure 29). Cette membrane est riche en SM et Chol, recrutés à partir de la membrane érythrocytaire (Haldar et al, 2002). La formation de rafts lipidiques au sein de cette membrane serait crucial pour le développement du parasite (Samuel et al, 2001).

Le RTV, formé par le prolongement de la membrane de la VP, forme un long réseau (surface d'échange importante). Il est également impliqué dans l'importation de diverses molécules organiques (nucléosides, acides aminés et protéines) et dans le recrutement du Chol. Issu de la membrane de la VP, le RTV est aussi riche en SM.

V.1.3. Intervention de l'hématine et de ses dérivés dans le processus de détoxification

Nous l'avons vu lors de la description des différents stades de développement du parasite, la digestion de l'Hb est une étape critique. En effet, pour garantir son développement au sein de l'hématie, le parasite utilise les produits de la digestion (les acides aminés) pour sa propre synthèse protéique. La partie non protéique, l'hème ferrique (ou ferriprotoporphyrine IX), n'est pas métabolisée ou recyclée mais elle est cristallisée en pigment inerte, l'Hz.

V.1.3.1. Digestion de l'hémoglobine

Lors d'une infection par *P. falciparum*, environ 80 % de l'Hb est digérée sous l'action combinée de différentes enzymes protéolytiques : d'abord, les plasmepsines I, II puis IV, ensuite les falcipaines 1, 2 et 3, une enfin une falcilysine (Francis et al, 1997; Gorke et al, 2013). Le transport de l'Hb, vers la vacuole digestive (VD), s'effectue via les vésicules cytosomales, par invagination des membranes du parasite et de la VP (Figure 29). Dans la littérature, deux lieux de dégradation sont évoqués : (i) soit les molécules d'Hb seraient dégradées, uniquement dans la VD (Klonis et al, 2010), (ii) soit ce processus de digestion débiterait plus tôt dans les vésicules cytosomales pour finir dans la VD (Hempelmann et al, 2003).

V.1.3.2. Détoxification de l'hématine

Lors du processus de digestion de l'Hb, l'hème, est libéré. Dans la VD, milieu riche en oxygène et à pH acide, celui-ci est rapidement oxydé en hématine. Chez l'Homme, cette molécule est catabolisée par voie enzymatique. Cependant, le parasite, dépourvu d'hème oxygénase pour dégrader cette molécule toxique, a dû développer d'autres mécanismes, alternatifs, pour la détoxification de l'hématine. Le processus majeur emprunté par le parasite est la conversion de l'hématine en cristal inerte, l'Hz. En effet, Egan et ses collaborateurs ont montré que, par cette voie, 95 % du fer contenu dans le parasite était retrouvé sous la forme

de ce pigment (Egan et al, 2002). Ainsi, ce mécanisme de formation de l'Hz apparaît donc comme une étape vitale pour le parasite.

L'hématine en solution peut se retrouver sous diverses formes selon l'environnement physiologique (Figure 31). En effet, selon le pH du milieu ou bien de la force ionique, l'hématine peut exister sous forme de monomère, sous formes dimériques, ou encore sous forme non cristalline agrégée (Gorka et al, 2013).

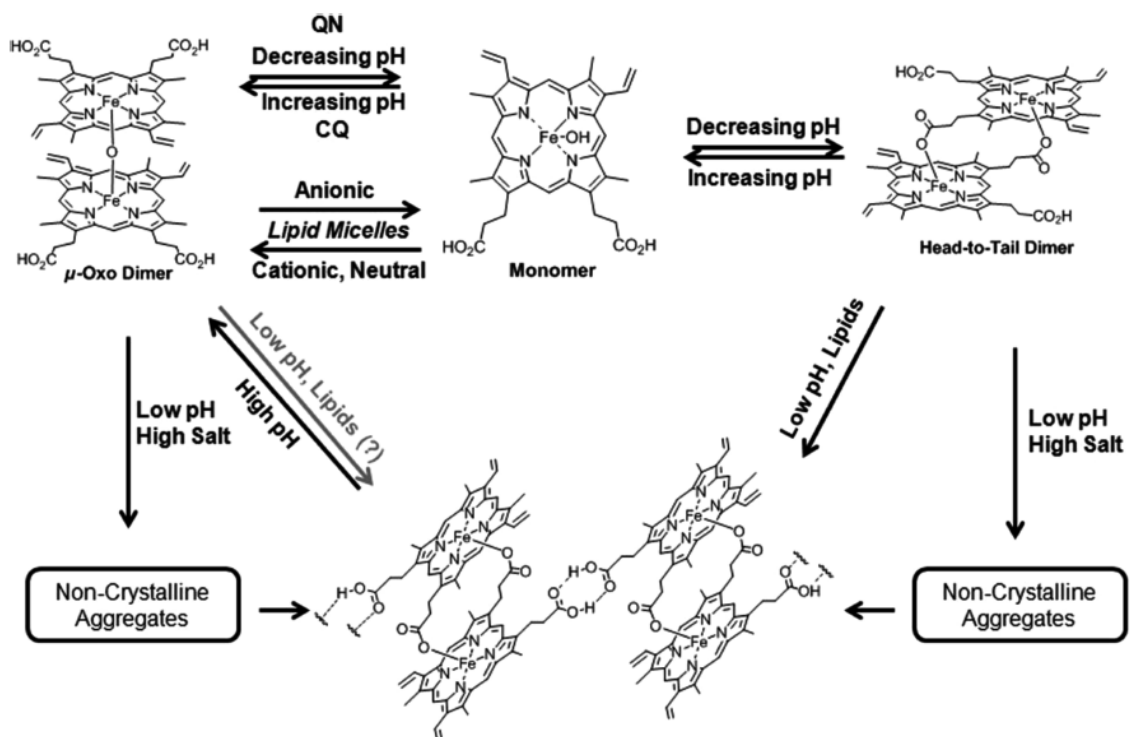


Figure 31. Différentes formes de l'hématine en solution et les différentes voies associées de conversion de l'hématine monomérique en hématoïne.

L'hématine est majoritairement sous forme monomérique à faible concentration et à pH neutre, alors que la dimérisation est favorisée à pH acide. Les formes dimériques peuvent être stabilisées par des liaisons de coordinations pour former un dimère stable (dimère H-T pour Head-to-Tail), indispensable à la formation de l'hématoïne. Adaptée de (Gorka et al, 2013)

Le dimère « Head-to-Tail » ou dimère H-T, est formé par une liaison de coordination entre l'acide propionique et le fer. Il constitue l'unité de base du cristal d'Hz (Egan, 2008a). Néanmoins, même si la nature chimique du cristal est connue, la formation de celui-ci au sein de la VD, est encore inconnue. En effet, les facteurs biologiques contrôlant la conversion entre formes monomériques, formes dimériques (μ -oxo et π - π), dimères H-T et les formes agrégées ne sont pas complètement élucidés.

Cependant, des études récentes ont défini certains paramètres influant l'équilibre monomère/dimères (Figure 31). Ainsi, à un pH neutre et à faible concentration en hématine, la forme monomérique prédomine, alors que l'acidification du pH (5,2 - 5,5) favorise la dimérisation, basculant l'équilibre dimères/monomère à un ratio 50:1 (Gorka et al, 2013). Toutes les formes de l'hématine en solution sont donc en étroit équilibre avec la libération continue de la forme monomérique (due à la dégradation de l'Hb) ainsi qu'avec l'élongation du cristal d'Hz.

Les mécanismes moléculaires de la formation de l'Hz, encore mal connus²³, sont paradoxalement la cible de la grande majorité des antipaludiques utilisés (quinine, chloroquine...). En effet, ces molécules perturbent l'équilibre monomère/dimères (Casabianca et al, 2008), inhibent la formation de l'Hz et conduisent alors à la mort du parasite. Face aux nombreuses résistances développées par les parasites, il est devenu primordial d'élucider les processus moléculaires impliqués dans la formation de ce cristal ainsi que le mécanisme d'action des molécules antipaludiques, dans le but de développer de nouvelles voies thérapeutiques.

V.1.3.3. Intervention des lipides dans le processus de détoxification

Des pistes récurrentes, retrouvées dans la littérature, suggèrent que les lipides sont impliqués dans le processus de détoxification de l'Hz. En effet, l'équipe d'Egan a, depuis plusieurs années, essayé de prouver le rôle catalyseur des lipides dans la formation du cristal d'Hz (Egan et al, 2006). Selon eux, les corps lipidiques neutres retrouvés dans la VD, catalyseraient la cristallisation de l'hématine (Hoang et al, 2010b). Des images, réalisées au microscope électronique à transmission, ont montré que la formation du pigment s'effectue à l'interface lipide/eau, suggérant ainsi que la nucléation du cristal au niveau de cette interface serait favorisée par l'interaction de l'hématine avec la tête polaire des lipides (Hoang et al, 2010a).

D'autres travaux, ont suggéré que la dégradation de l'Hb débiterait dès leur transport dans les vésicules cytosomales. L'hématine libérée, au contact de la membrane interne des vésicules cytosomales (Figure 29), serait convertie en microcristaux, précurseurs d'Hz (Hempelmann et al, 2003). Dans son postulat, Hempelmann suggère que l'environnement hydrophobe de la

²³ Les hypothèses concernant ce processus n'ont cessé d'évoluer : (i) mécanisme catalysé par une enzyme, l'hème polymérase, (ii) phénomène spontané ou auto-catalytique, ou encore (iii) processus de biominéralisation impliquant des lipides et/ou des protéines.

membrane interne favorise la dimérisation de l'hématine. La membrane de la VP, déstabilisée par ce processus, serait alors sacrifiée permettant la formation de microcristaux inerte garantissant d'une part, l'intégrité de la membrane externe et d'autre part, sa conversion en pigment d'Hz dans la VD (Figure 32).

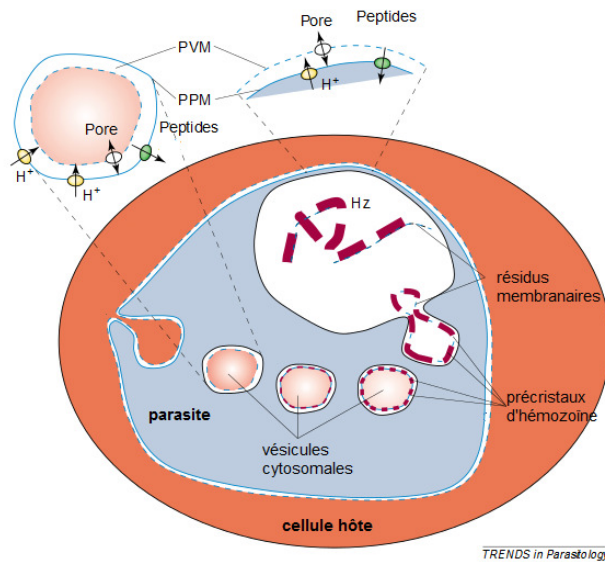


Figure 32. Mécanisme de formation de l'hémozoïne proposé par Hempelmann

Le cytoplasme de l'hématie, contenant l'hémoglobine, est confiné dans les cytosomes (CYT) formant les vésicules cytosomales. Celles-ci sont acidifiées par l'action des pompes à protons de la membrane externe (trait plein). La dégradation de l'hémoglobine s'effectue dans les vésicules cytosomales ; l'hème libéré rentre au contact de la membrane interne (en pointillés). La forte concentration en hème provoque sa conversion en microcristaux à l'interface lipidique. La fusion des vésicules cytosomales avec la VD libère les précurseurs d'hémozoïne ainsi que les débris membranaires de la membrane interne sacrifiée. D'après (Hempelmann et al, 2003)

L'intervention des lipides dans le processus de détoxification de l'Hz est, depuis peu, admise par une grande partie de la communauté scientifique. Cependant, le rôle exact de ceux-ci demeure encore matière à débat. Ainsi, nous nous sommes proposés d'évaluer le comportement des différentes formes d'hématine en solution décrites précédemment au contact de membranes lipidiques modèles.

V.2. Rôle des membranes biologiques dans les études toxicologiques liées à l'émergence des nanotechnologies

L'émergence des nanotechnologies a révolutionné le monde des sciences et de l'industrie. Le terme « nanotechnologies », au pluriel, se définit par « *la recherche, le développement et la fabrication de structures, dispositifs ou systèmes à partir de procédés permettant de structurer la matière au niveau atomique, moléculaire ou supramoléculaire, à des échelles caractéristiques de 1 à 100 nm* »²⁴. Cette échelle de mesure (défini par l'US National Nanotechnology Initiative) n'est qu'indicative puisque aucune étude scientifique n'a jusqu'alors justifié cette limite de 100 nm (Saner & Stoklosa, 2013). Quoi qu'il en soit, la miniaturisation de ces systèmes permet alors d'accéder à de nouvelles propriétés physico-chimiques qui sont alors exploitées soit pour améliorer des protocoles existants (catalyseurs) soit pour élaborer des nouveaux matériaux. Le potentiel et la diversité (tant par la nature que par les propriétés physico-chimiques) de tous ces nouveaux nanomatériaux font des nanotechnologies un secteur économique en plein essor, promettant, entre autres, des solutions aux grands défis du XXI^e siècle dans les domaines de la santé, de l'énergie, de l'environnement, de l'agroalimentaire (Tierney et al, 2013). Cependant, la production massive et l'utilisation de ces nanomatériaux dans de nombreux produits de la consommation courante conduisent les scientifiques à s'interroger sur les conséquences sociétales de ce développement et notamment sur leur cycle de vie et leur innocuité (Dillemath et al, 2011). De plus, la précédente révolution industrielle a fortement marqué la société sur les conséquences d'un essor extrêmement rapide et des leçons à en tirer (Maynard, 2007). C'est dans ce contexte que de nombreuses études ont été menées afin d'évaluer le potentiel toxique de ces nanomatériaux et leur impact sur la santé (Maynard, 2012).

²⁴ Définition proposée par Eric Gaffet, directeur de recherche au CNRS, Nanomaterials Research Group/ UMR CNRS 5060

V.2.1. Les nanoparticules: produits issus des nanotechnologies ?

V.2.1.1. Diversité des nanoparticules et classification

Le terme de nanoparticule (NP) est très largement employé pour désigner des nano-objets dont une des dimensions est inférieure à 100 nm. Il existe une grande diversité de NPs aussi bien naturelles (provenant d'éruptions volcaniques, de feux de forêt, gaz d'échappement) que synthétiques, issues de l'ingénierie (Figure 33).

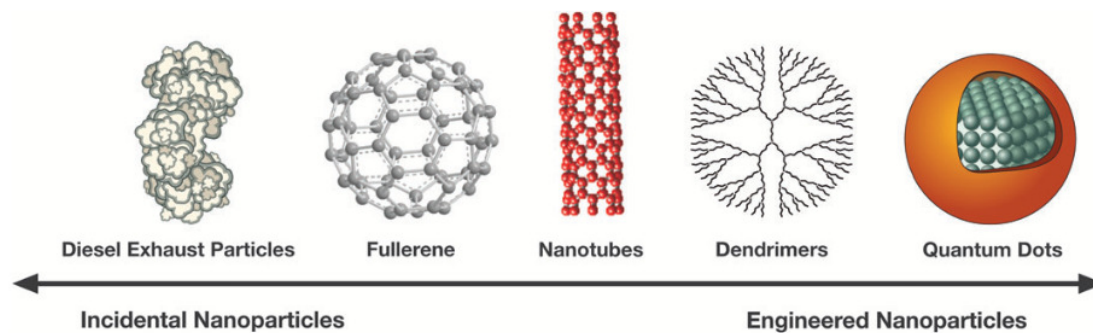


Figure 33. Diversité des NPs d'origine naturelle ou produits issus de l'ingénierie
D'après (Stern & McNeil, 2008)

Les NPs peuvent être classées (de même que définies) selon leur nature, leur morphologie, leur taille, ou bien leurs propriétés (Saner & Stoklosa, 2013). Cependant, il n'existe pas de taxonomie établie pour classer ces NPs ; mais différentes catégories peuvent les dissocier :

- Les NPs métalliques magnétiques (SPIONs²⁵) ou non-magnétiques (d'or ou d'argent)
- Les NPs de carbone (fullerènes, NTC²⁶, noir de carbone, nanofeuillet de graphène)
- Les NPs céramiques (TiO₂, SiO₂, ZnO)
- Les NPs organiques (dendrimères, liposomes fonctionnalisés)

Aujourd'hui, beaucoup de NPs produites sont hybrides, c'est-à-dire de composition mixte (Elsaesser & Howard, 2012), rendant l'élaboration d'une taxonomie plus difficile mais permettant, par la multitude de combinaisons possibles, de décupler leurs propriétés de ces NPs (Acharya, 2013; Chang et al, 2009; Yang et al, 2009).

²⁵ SPIONs : Superparamagnetic iron oxide nanoparticles

²⁶ NTC : NanoTube de Carbone. Il existe deux types de NTC : les monofeuillets, (*Single-walled Carbon Nanotubes* en anglais, SWNT), et les multifeuillets, (*Multi-walled Carbon Nanotubes* en anglais, MWNT)

V.2.1.2. Propriétés et applications

- Caractéristiques des NPs

Nous l’avons évoqué précédemment, la diminution de taille des matériaux à l’échelle nanométrique entraîne une modification de leurs propriétés. Ainsi, ce ne sont plus les paramètres mécaniques classiques qui régissent la stabilité, la réactivité, ainsi que la fonction des NPs, mais leur dimension atomique individuelle, ainsi que les interactions qu’elles peuvent établir entre elles et avec leur environnement. La taille, la nature chimique, les propriétés de surface, la charge (Tableau 4) font parties des caractéristiques déterminantes du comportement global et local des NPs utilisées, affectant par conséquent leurs propriétés (Ostiguy et al, 2010).

Tableau 4. Caractéristiques des NPs influant sur leurs propriétés :

Paramètres
Masse / Concentration / Nombre de particules
Composition chimique / Pureté / Structure cristalline
Solubilité / Hydrophobicité / Hydrophilicité
Surface spécifique / Degré d’agglomération – agrégation
Porosité
Taille / Distribution granulométrique / Forme
Charge (potentiel zéta) / réactivité / groupement fonctionnels / potentiel redox / recouvrement de surface
Age des particules
Biopersistence / biodégradation
Méthode de synthèse

D’après (Ostiguy et al, 2010)

Beaucoup d’études se sont intéressées à démontrer l’influence de ces paramètres sur leur cytotoxicité. Ainsi, elles ont pu mettre en lumière l’importance de la taille des NPs de quelque nature que ce soit, (Gurr et al, 2005; Li et al, 2008), de la chimie de surface, ou encore du revêtement (Ahamed et al, 2008). La caractérisation des NPs, dans leur environnement, est donc primordiale pour pouvoir comparer/exploiter les résultats.

- Propriétés des NPS et domaines d’applications

Les NPs possèdent de nombreuses propriétés mécaniques, électriques, thermiques, magnétiques, optiques ou encore catalytiques. Selon leur nature, elles peuvent combiner

plusieurs de ces propriétés qui sont alors exploitées dans de nombreux champs d'applications (Tableau 5).

Au vu de la grande diversité de la nature des NPs, de leurs propriétés et des champs d'application, la production ainsi que l'utilisation de ces nouveaux matériaux concerne la plupart des secteurs d'activité : l'énergie, l'environnement, la construction, la chimie, l'aéronautique, l'automobile, l'agro-alimentaire, la santé, la cosmétique, le textile, la papeterie, l'outillage, l'électronique...(AFSSET, 2006; Nessler et al, 2010)

En ce qui concerne le secteur de la santé, les nanotechnologies sont consacrées notamment à la thérapie anti-cancéreuse (Brown et al, 2010; Thevenot et al, 2008), le diagnostic et l'imagerie médicale (Cormode et al, 2010; Fang & Zhang, 2009; Howell et al, 2013), l'appareillage de prothèses ou d'électrodes (Bignozzi et al, 2012; Zhang et al, 2012a), et la vectorisation ciblée de médicaments (Vauthier et al, 2013).

Tableau 5. Diversité des domaines d'applications et des propriétés exploitées par type de nanoparticules :

Type de NPs	Nouvelles propriétés	Applications
Fullerènes (C ₆₀)	Haute affinité électronique	Propriétés magnétiques améliorées
	Antioxydant	Catalyseurs – Pyrolyse – lubrifiants
	Résistance physique	Cellules solaires Vecteur de médicaments ...
TiO ₂	Propriétés optiques anti-UV et transparent au visible	Cellules solaires, crèmes solaires anti-UV, peintures anti-UV
	Effet photocatalytique	Traitement environnemental (eau usées/air)
		Matériel autonettoyant Agent antimicrobiens
Quantum Dots	Propriétés colorimétriques et électroniques	Colorants
		Imagerie médicale, thérapie médicale
		Cellules solaires
		Catalyseurs
NTC	Bon conducteur électrique Grande force mécanique	Matériaux ultrarésistants
		Nanoélectronique, ordinateur quantique
		Biocapteur, capteur chimique
		Dissipateur d'électricité statique
Noir de carbone	Surface importante	Industries du caoutchouc, de la peinture et des encres
Nano-argiles	Catalyse	Raffinage du pétrole
	Force, dureté	Additif au caoutchouc
	Résistance à la chaleur	Retardateur de flammes
		Renforcement mécanique
Liposomes	Composants biodégradables	Vecteur de médicaments, usage vétérinaire

D'après (Gaffet, 2008)

V.2.1.3. Un marché en plein essor

La commission européenne a estimé que le marché mondial des nanotechnologies en 2001 s'élevait à 40 milliards d'euros alors qu'en 2008 il devait atteindre déjà près de 700 milliards d'euros (Gaffet, 2008). En 2010-2015, les enjeux économiques mondiaux liés à l'émergence des nanotechnologies devraient atteindre 1 000 milliards d'euros par an (tous secteurs d'activité confondus ; selon la *National Science Foundation*) dont 340 milliards pour le seul secteur des nanomatériaux. Outre l'aspect économique, les nanotechnologies représenteraient

15 % de l'activité manufacturière mondiale²⁷ conduisant à l'emploi de près de 2-3 millions de personnes supplémentaires dans le monde (Gaffet, 2008).

Cette croissance exponentielle est en partie due et soutenue par des investissements publics considérables qui en 2004 s'élevaient à 740 millions d'euros en Europe. Même si l'effort public est du même ordre de grandeur pour les pays leaders (États-Unis, Japon, Europe), la part de l'investissement privé dans le domaine des nanosciences et nanotechnologies en 2004, s'élevait à 1,7 milliard d'euros pour les États-Unis contre 580 millions d'euros pour l'Europe. Par ailleurs, une évaluation de 2006, effectuée par le PEN (*Project on Emerging Nanotechnologies*), indique que l'Europe investit près de deux fois plus que les États-Unis dans la recherche pour la prévention des risques. En 2011, près de 1 300 produits issus des nanotechnologies ont été commercialisés et sont estimés à 3 400 d'ici 2020²⁸. Ainsi, face au développement massif des nanotechnologies nous pouvons nous interroger sur l'impact sanitaire dû à l'exposition quotidienne avec ces NPs.

V.2.2. Exposition aux nanoparticules : un risque pour la santé ?

De leur production (synthèse ou extraction), à leur recyclage ou dispersion, chaque étape du cycle de vie des NPs représente un risque d'exposition aussi bien pour l'homme (producteur/consommateur) que pour l'environnement (dispersion dans l'eau, le sol et l'air).

V.2.2.1. Voies d'exposition

L'évaluation des risques débute par une estimation des risques d'exposition et de la caractérisation des dangers. Cependant, à l'heure actuelle, les études portant sur l'exposition aux nanomatériaux de manière générale et des risques associés font cruellement défaut (Warheit et al, 2007; Warheit et al, 2008). Ainsi, il est très difficile d'évaluer l'exposition et de la quantifier, de même que de mesurer les risques liés sur les mécanismes de défense mis en jeu. Les différentes sources d'exposition aux NPs conduisent à leur entrée éventuelle par les voies respiratoires, cutanées, digestives, et dans le cas des applications biomédicales, parentales (Stern & McNeil, 2008).

²⁷ D'après le « dossier documentaire : les nanotechnologies » du ministère de l'économie et des finances. Publié en octobre 2008 et modifié le 14 février 2013.

Lien : <http://www.economie.gouv.fr/cedef/dossier-documentaire-nanotechnologies>

²⁸ www.nanotechproject.org

L'inhalation des NPs est de loin la voie d'exposition la plus importante. En effet, très volatiles, elles peuvent être respirées à de longues distances de la source (grâce aux mouvements Brownien). L'exposition est amplifiée du fait de l'étendue de la surface d'échange au niveau des poumons (entre 75 et 140 m²). Malgré cela, très peu d'études sur la dispersion dans l'air des NPs manufacturées ont été menées (Stern & McNeil, 2008). Néanmoins, des travaux récents sur l'exposition potentielle aux poudres issues des nanotechnologies ont été conduits. En effet, une équipe américaine, s'est intéressé aux risques de contact et d'inhalation de poudres cosmétiques et de spray, issus des nanotechnologies afin de les comparer aux produits analogues classiques (Nazarenko et al, 2011; Nazarenko et al, 2012).

D'autres chercheurs ont porté leur attention sur l'interaction des NPs avec la peau, notamment à cause de leur incorporation croissante dans le textile de l'habillement et les produits cosmétiques. En effet, beaucoup d'études se sont focalisées sur la capacité des NPs de TiO₂, utilisées comme filtre anti-UV ou antimicrobiens, de pénétrer les couches de l'épiderme (Baroli, 2010). Au terme de ces travaux, il apparaîtrait que ces NPs ne pénètrent pas dans l'épiderme mais restent en surface ou dans les follicules pileux (Baroli, 2010; Larese et al, 2009). Néanmoins, le sujet des risques potentiels étant très sensible, les chercheurs alertent la communauté scientifique sur l'importance de la caractérisation approfondie des NPs (cf. Tableau 4) utilisées dans les études avant de statuer sur les risques potentiels (amalgame entre des NPs « modèles » et des NPs manufacturées) sur la santé (Baroli, 2010; Rancan et al, 2012).

V.2.2.2. Evaluation des risques : études de cytotoxicité

Durant les 5 dernières années, les études de cytotoxicité des NPs ont considérablement augmenté. A l'instar des études précédentes sur les risques d'exposition, les résultats des nombreuses investigations de la cytotoxicité des NPs ne sont pas toujours clairs. Par exemple, Gurr et ses collaborateurs ont reporté que les NPs de TiO₂ induiraient un stress oxydatif des cellules (Gurr et al, 2005). A l'inverse, d'autres auteurs ont montré que, même à fortes concentrations (3 mg/mL), elles n'étaient pas toxique pour les cellules (Sayes et al, 2006). Cependant, beaucoup d'études ont montré l'internalisation de NPs dans les cellules sans pour autant prouver leur cytotoxicité (Rancan et al, 2012).

Même si les résultats sont souvent objets de controverses, il apparaît évident aujourd'hui, que l'exposition aux NPs de diverses natures que ce soit est avérée. Par conséquent, nous pouvons nous interroger sur l'interaction entre les NPs et les membranes cellulaires d'autant qu'il a été démontré une possible internalisation des NPs (Chithrani & Chan, 2007; Leroueil et al, 2007).

V.2.2.3. interaction des NPs avec les membranes lipidiques des cellules

La plupart des études sur l'interaction des NPs avec les membranes cellulaires sont menées avec des NPs organiques (notamment de type dendrimère), de silice (SiO₂) ou encore de polystyrène. Toutes s'accordent à dire que les charges entourant ces NPs peuvent induire une altération locale des propriétés physiques des lipides membranaires (Dawson et al, 2009). En effet, des travaux récents ont démontré que les NPs provoquaient une diminution de la T_m des lipides membranaires (Santhosh et al, 2012; Westerhausen et al, 2012) changeant ainsi leur fluidité au sein de la membrane (Santhosh et al, 2012; Wang et al, 2008). En effet, Granick et ses collaborateurs ont prouvé que les NPs anioniques et cationiques interagissaient préférentiellement avec les lipides en phase fluide et gel respectivement, provoquant une « gélation » ou « fluidification », localisée (effet de NPs anioniques en Figure 34 C), selon l'état de phase (Wang et al, 2008). D'autres équipes ont également montré, que des NPs de petits diamètres (< 18 nm) étaient la cause de « gélations » locales, altérant ainsi la mobilité des phospholipides membranaires (Zhang et al, 2012b) alors que de plus grosses (diamètre dix fois plus élevé) étaient, quant à elles, internalisées, formant ainsi des protubérances à la surface de GUVs (Figure 34 A).

Parallèlement, d'autres équipes ont mis en évidence, grâce à la microscopie à force atomique notamment, des changements plus profonds comme la formation de trous dans des membranes modèles (cf. Figure 24) indépendamment de la taille, de la densité de charge, ou encore de la nature chimique des NPs testées (Kozlova et al, 2001; Leroueil et al, 2008; Leroueil et al, 2007). Enfin, très récemment, des chercheurs américains (Li & Malmstadt, 2013), ont démontré que les NPs cationiques pouvaient interagir très fortement avec des GUVs, conduisant à la formation de protrusions (Figure 34 B) à la surface de celles-ci (par repliement de la bicouche lipidique). Ainsi, l'augmentation de la tension de surface provoquerait l'apparition de pores dans la membrane de diamètre de l'ordre de 20 nm.

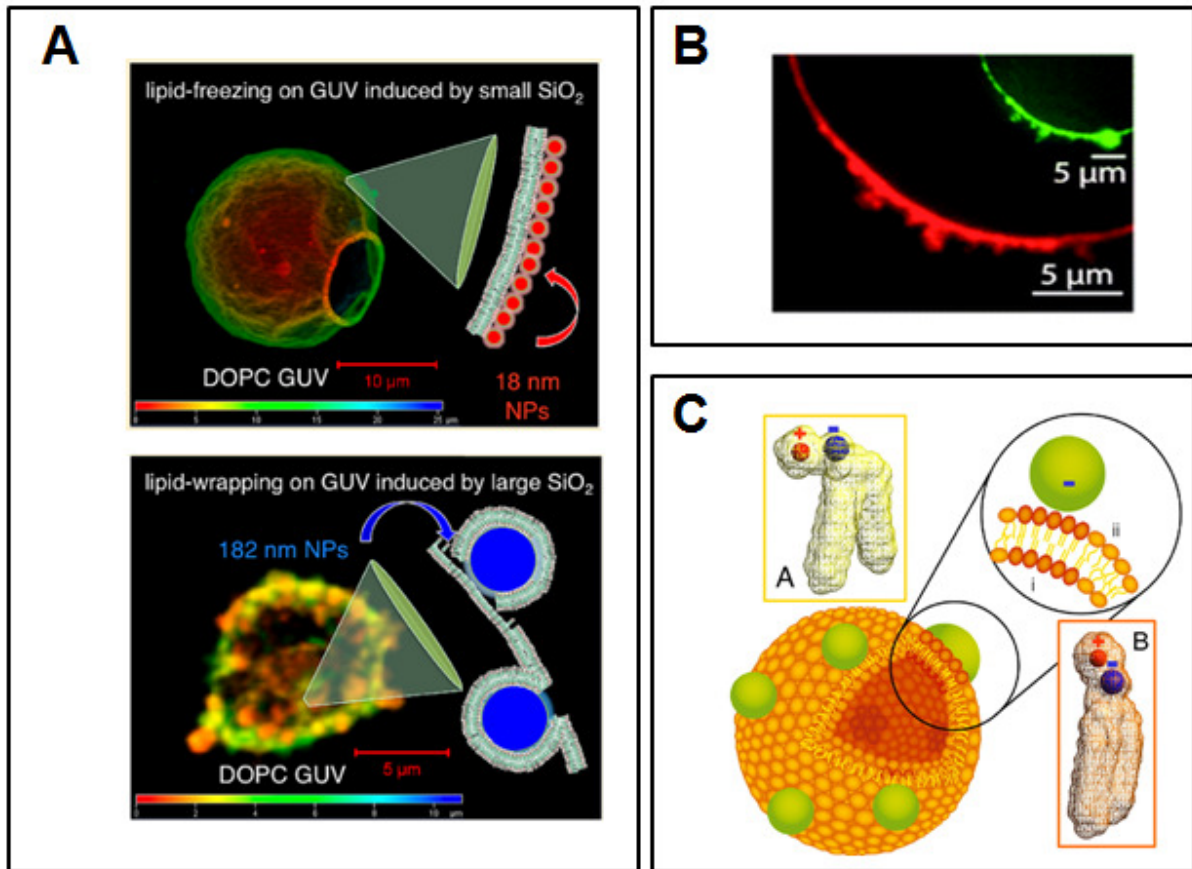


Figure 34. Interaction des NPs avec des membranes lipidiques modèles.

Les NPs de SiO₂ interagissent différemment avec des liposomes selon leur taille (A). Des NPs de petites tailles (< 18 nm) induisent une « gélation » locale, altérant la mobilité des lipides, alors que des plus grosses (~ 180 nm) provoquent un enroulement de la membrane autour de celles-ci, formant des protubérances à la surface des liposomes. Une autre équipe, utilisant des GUVs de DOPC/DPPC/Chol 1:1:1 (ratio molaire), a montré que des NPs de polystyrène induisaient également la formation de protrusions (B) à la surface des liposomes pouvant conduire à la formation de pores. Enfin, d'autres chercheurs ont mis en évidence le rôle de la charge des NPs (de polystyrène) dans la « gélation » ou « fluidification » des phospholipides membranaires. Ainsi, des NPs anioniques provoqueraient une « gélation » locale (C), par redressement des molécules lipidiques, et inversement. D'après (Li & Malmstadt, 2013; Wang et al, 2008; Zhang et al, 2012b)

A travers toutes ces études, il apparaît clairement que les NPs interagissent fortement avec les membranes lipidiques des cellules. Par la suite, nous allons cibler nos travaux de recherche sur des NPs manufacturées très utilisées dans de nombreux secteurs d'activité : les NPs de dioxyde de titane (TiO₂).

V.2.3. Les NPs de TiO₂

Dans la nature, le TiO₂ existe sous 3 formes cristallines de minerais : l'anatase (Figure 35), le rutile et plus rarement le brookite. L'unité de structure, pour les deux formes cristallines, se

compose d'un ion de Ti^{4+} entouré par 6 ions d' O^{2-} . Anatase et rutile diffèrent par l'organisation spatiale des liaisons Ti-O.

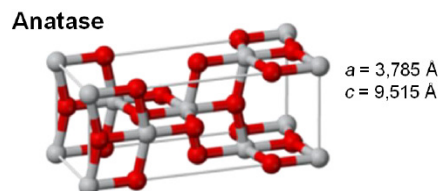


Figure 35. Schéma de la forme cristalline d'anatase

En rouge sont représentés les atomes d'oxygène (O) et en gris, ceux de titane (Ti). Les paramètres de maille sont décrits ci-contre. D'après (Linsebigler et al, 1995)

Les NPs de TiO_2 sont synthétisées à partir de différentes méthodes chimiques ou physiques détaillées dans la revue de Chen et Mao (Chen & Mao, 2007). Les oxydes métalliques (dont les NPs de TiO_2 font partie) sont les nanoparticules les plus commercialisées actuellement (sous forme de poudres ou de suspensions liquides). Par exemple, les marchés liés aux produits cosmétiques en utilisent actuellement 1000 à 2000 tonnes par an dans le monde²⁹. Outre les produits cosmétiques, les NPs de TiO_2 sont retrouvés dans de nombreux produits agroalimentaires tels que des bonbons, des crèmes dessert, des chewing-gums... (Figure 36) où ils sont utilisées en tant que pigment, agent brillant, ou catalyseur. Les propriétés photocatalytiques des NPs de TiO_2 ont également fasciné l'intérêt des chercheurs dans le développement d'applications prometteuses de cellules photovoltaïques ou électrochimiques, aux capteurs photocatalytiques (Chen & Mao, 2007).

Utilisant les formes cristallines pures (d'anatase ou de rutile) ou en mélange, les NPs de TiO_2 peuvent être employées comme additifs (référéncés E171) ou encore comme bactéricides améliorant la qualité et la durée de vie des produits. Dans une étude très complète sur les NPs de TiO_2 dans l'alimentation et les produits cosmétiques, Weir et ses collaborateurs ont déterminé que la majorité des NPs de TiO_2 , qui sont retrouvées dans ces produits, mesurent entre 70 et 130 nm. Ils ont également évalué le taux de NPs de TiO_2 dans l'organisme à 2 $mg_{(TiO_2)}/kg/jour$, avec une très forte exposition quotidienne des 3-6 ans (étude sur la population américaine). Depuis 2006, les NPs de TiO_2 ont été classées comme

²⁹ Données issues du rapport d'expertise collective de L'Afsset intitulé : « Nanomatériaux et sécurité du travail ». Publication mai 2008. <http://www.afsset.fr/index.php?pageid=452&newsid=359&MDLCODE=news>

potentiellement cancérogènes (catégorie 2B) par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC).

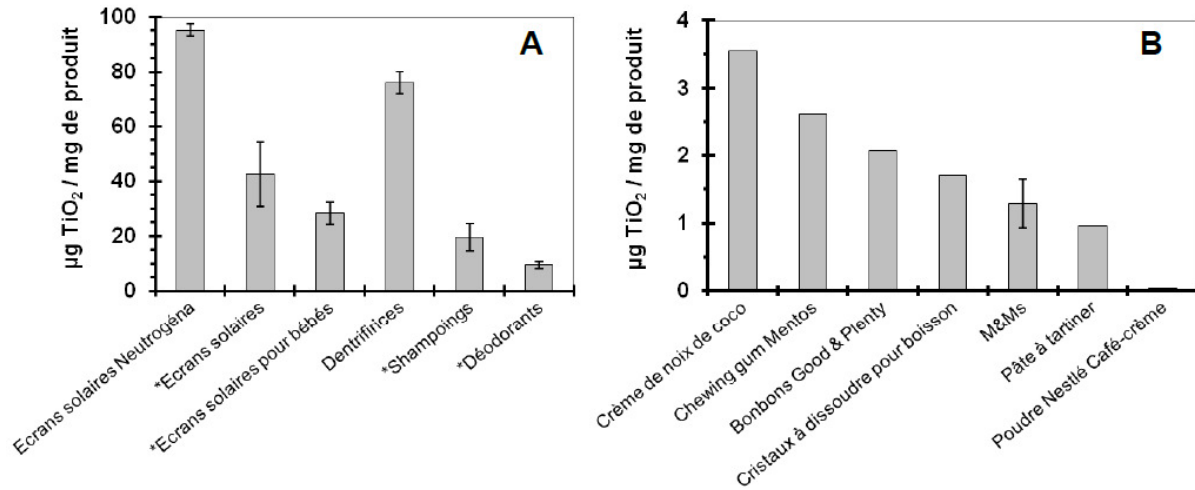


Figure 36. Quantité de NPs de TiO₂ dans les produits cosmétiques (A) et agroalimentaires (B)

Les catégories précédées d'un astérisque (*) peuvent comporter des produits ne mentionnant pas la présence de TiO₂ sur l'emballage. D'après (Weir et al, 2012)

L'utilisation des NPs de TiO₂ est désormais envisagée, dans le diagnostic et la thérapie anti-cancéreuse (Ninomiya et al, 2013; Ninomiya et al, 2012). L'ingénierie osseuse (dentaire, orthopédique...) s'intéresse également aux NPs de TiO₂ dans l'optique de diminuer les risques infectieux et d'améliorer l'ostéo-intégration de l'implant (Divya Rani et al, 2012).

Face à la multitude d'applications possibles utilisant les NPs de TiO₂ et sa présence dans de nombreux produits de la consommation courante, les risques d'exposition aussi bien par les voies respiratoires, digestives et cutanées, sont avérés. Ainsi, nous nous sommes proposés d'étudier l'effet des NPs de TiO₂ sous la forme cristalline d'anatase au contact de modèles membranaires la composition des membranes pouvant être exposées (par inhalation ou digestion).

Matériels & Méthodes

Chapitre I. Préparation des modèles membranaires

I.1. Les lipides utilisés

L'ensemble des lipides utilisés, purs à 99 % (95 % pour la SM), sont commercialisés par Sigma Aldrich. Les lipides, se présentant sous forme de poudre, sont solubilisés dans du chloroforme puis sont conservés à -20°C . La structure des lipides utilisés pour les différentes études menées dans ce travail est présentée sur la Figure 37.

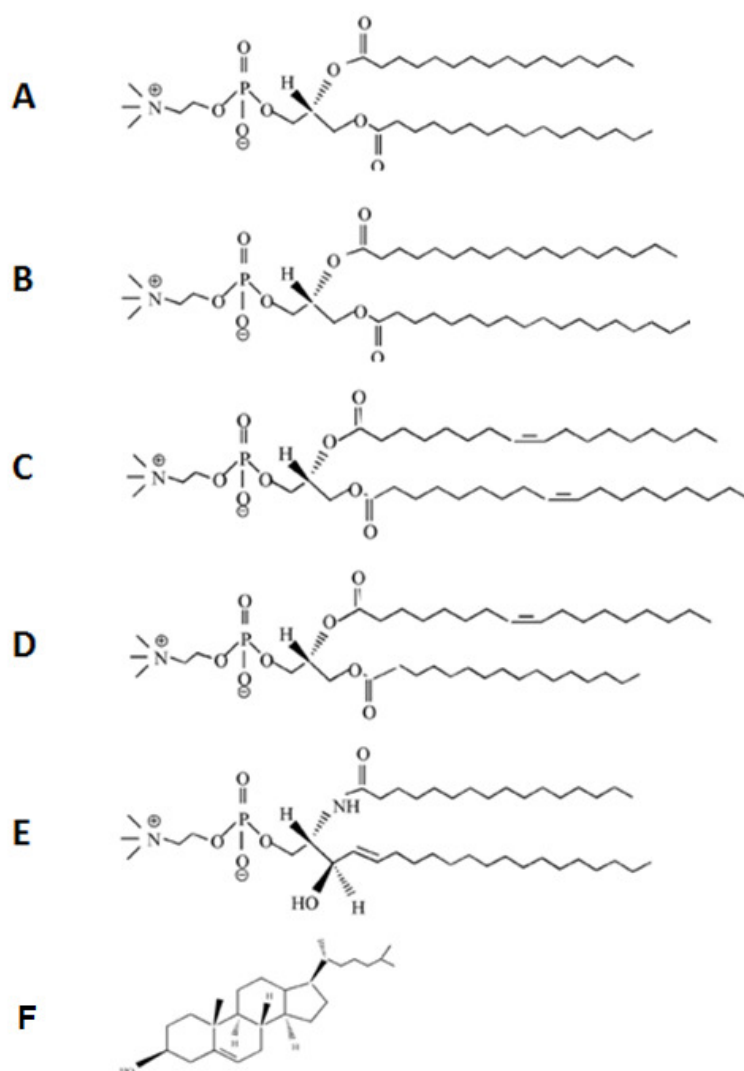


Figure 37. Structure des lipides utilisés dans ce travail.

A : DPPC, B : DSPC³⁰, C : DOPC, D : POPC, E : SM du jaune d'œuf et F : Chol

³⁰ DSPC : 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

I.2. Les monocouches de Langmuir

Les lipides sont tout d'abord solubilisés dans un mélange hexane/Ethanol 9:1 (v/v) qui présente un meilleur coefficient d'étalement que le chloroforme (Cadenhead et al, 1974). Néanmoins, le choix du solvant est aussi lié à sa capacité de solubiliser les molécules amphiphiles. Ainsi, le dépôt de l'hématine à l'interface air/tampon est réalisé dans un mélange chloroforme/méthanol 7:3 (v/v). Une microseringue (Hamilton) est utilisée pour le dépôt des molécules. Si les molécules déposées sont insolubles dans la sous-phase, leur aire moléculaire peut toutefois être déterminée grâce à l'équation suivante :

$$\text{Aire moléculaire} = \frac{\text{Aire totale}}{N C V} \text{ (}\text{\AA}^2/\text{molécule}\text{)}$$

Où N représente le nombre d'Avogadro ($6,02 \cdot 10^{23}$ molécules/mole), C la concentration de la molécule amphiphile (mol/L) et V le volume déposé à l'interface air/tampon (L).

I.3. Les liposomes

Les lipides, solubilisés dans le chloroforme, sont mélangés dans les proportions spécifiques selon les expérimentations, puis sont séchés sous flux d'azote et placés sous une cloche à vide pendant 2 heures afin d'éliminer toutes traces de solvant. Le film sec ainsi formé est ensuite remis en suspension dans du tampon TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM) + CaCl₂ (à 3 mM) par agitation mécanique (vortex) conduisant à la formation de MLVs.

I.3.1. Obtention de SUVs par sonication

La sonication de la solution de MLVs, à l'aide d'un sonicateur 500 W (Fisher Bioblock Scientific) muni d'une sonde en titane de 13 mm de diamètre, permet d'obtenir des vésicules unilamellaires de petites tailles. Ainsi, la suspension de MLVs subit 3 cycles de sonication de 2 min 30, à 33 % de la puissance maximale, dans un bain de glace. Les SUVs obtenues sont finalement filtrées sur un filtre Acrodisc® (Pall LifeSciences, USA) de diamètre de 200 nm pour éliminer les particules de titane libérées par la sonde pendant les cycles de sonication. La suspension de SUVs est ensuite stockée à température ambiante à l'abri de la lumière jusqu'à 4 jours.

I.3.2. Obtention de LUVs par extrusion

Pour l'obtention de LUVs, la suspension de MLVs est extrudée 19 fois à 50°C, à travers une membrane de polycarbonate (Avestin) de 200 nm de diamètre, à l'aide d'un extrudeur de type Lipofast (Avestin Inc.). Du fait de son instabilité, la suspension de LUVs doit être ensuite utilisée très rapidement.

I.4. Les bicouches lipidiques supportées (SLBs)

Les bicouches lipidiques planes sont obtenues par fusion d'une suspension de SUVs (préparées selon le protocole détaillé précédemment en I.3.1) sur un support de mica, préalablement collé thermiquement sur un disque d'acier (à l'aide d'une colle époxy). 150 µL de la suspension lipidique, à la concentration molaire appropriée, sont déposés sur des surfaces de mica fraîchement clivées. Selon la composition lipidique, les conditions de préparation des SLBs (temps d'incubation, concentration molaire et température) seront spécifiques (Tableau 6). Après incubation, chaque échantillon est rincé avec 3 mL de tampon TBS (sans calcium), afin d'éliminer les vésicules non fusionnées. Ce tampon de rinçage est incubé préalablement à la même température que les échantillons, pour éviter tout choc thermique. Les échantillons sont ensuite refroidis doucement pendant au moins 4 heures pour revenir à température ambiante. Enfin, ils sont stockés à 21°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à leur utilisation.

Tableau 6. Conditions de préparation des SLBs de différentes compositions lipidiques :

Composition lipidique (ratio molaire)	DOPC/DPPC (différents ratios)	DOPC/DSPC 1:1	DOPC/SM 1:1	DOPC/SM/Chol (différents ratios)
Concentration (mol/L)	0,5	0,1	0,5	0,5
Température (°C)	21 → 60	21 → 70	70	60
Temps d'incubation (min)	45	90	45	60

Chapitre II. Méthodes biophysiques de caractérisation des modèles membranaires

II.1. Tensiométrie de surface

Ces études ont été réalisées par Slim AZOUZI dans le cadre d'une collaboration entre nos deux thèses. Ses travaux sur la caractérisation des interactions de molécules antipaludiques avec des systèmes membranaires biomimétiques nous ont apporté de précieuses informations quant au comportement de l'hématine au contact de monocouches de Langmuir.

II.1.1. Isothermes de compression

La cuve utilisée pour ces expérimentations est une cuve commerciale de marque KSV (Minitrough 2, KSV instruments Ltd., Helsinki, Finland). Les dimensions de cette cuve (7,5 cm × 28 cm) permettent d'étudier l'organisation aussi bien de molécules pures que de monocouches mixtes de lipides/hématine. Cette cuve est équipée de deux barrières mobiles et d'une balance de Wilhelmy pour mesurer la pression de surface. Elle est munie d'un dispositif de régulation thermique permettant de contrôler la température de la sous-phase aqueuse à une valeur constante de (21 ± 1) °C. Le revêtement de la cuve ainsi que des barrières, en Téflon[®], sont nettoyés régulièrement afin de garantir la reproductibilité des résultats. Les parois de la cuve, les barrières ainsi que le capteur de pression, en papier, sont nettoyés avec du dichlorométhane, suivi d'éthanol et d'eau. Après nettoyage, la cuve est remplie de 200 mL de tampon et une compression des barrières est effectuée sans molécules déposées à l'interface. Lors de cette compression « test », les variations de pression ne doivent pas excéder 0,3 mN/m. La solution à analyser est déposée délicatement en surface de la sous-phase par petites gouttes à l'aide d'une microsiringue. Au contact de l'interface, les molécules sont étalées instantanément sur toute la surface de la sous-phase. Après dépôt, un délai de 15 minutes est à respecter, afin de garantir l'évaporation du solvant. La compression est enfin réalisée par déplacement des barrières mobiles à une vitesse constante de 10 cm²/min. L'isotherme π -A est alors enregistrée (graphique type d'une isotherme de compression dans la partie bibliographique, II.1.4. Les isothermes de compression).

II.1.2. Adsorption des molécules à aire constante

Les expérimentations de caractérisation du pouvoir membranotrope de l'hématine ont été réalisées sur un puits d'un volume de 64 mL, équipé d'un capteur NIMA possédant une surface de 20 cm². Le puits en Téflon[®] ainsi que le capteur de pression en papier sont nettoyés avec du dichlorométhane, suivi d'éthanol et d'eau. Après nettoyage, la cuve est remplie de tampon et les lipides sont déposés à l'interface air/tampon jusqu'à la pression souhaitée. Après évaporation du solvant (~ 15 min) et stabilisation de la monocouche à une certaine pression initiale (π), la solution d'hématine est injectée dans la sous-phase à l'aide d'une microseringue (Figure 38 A).

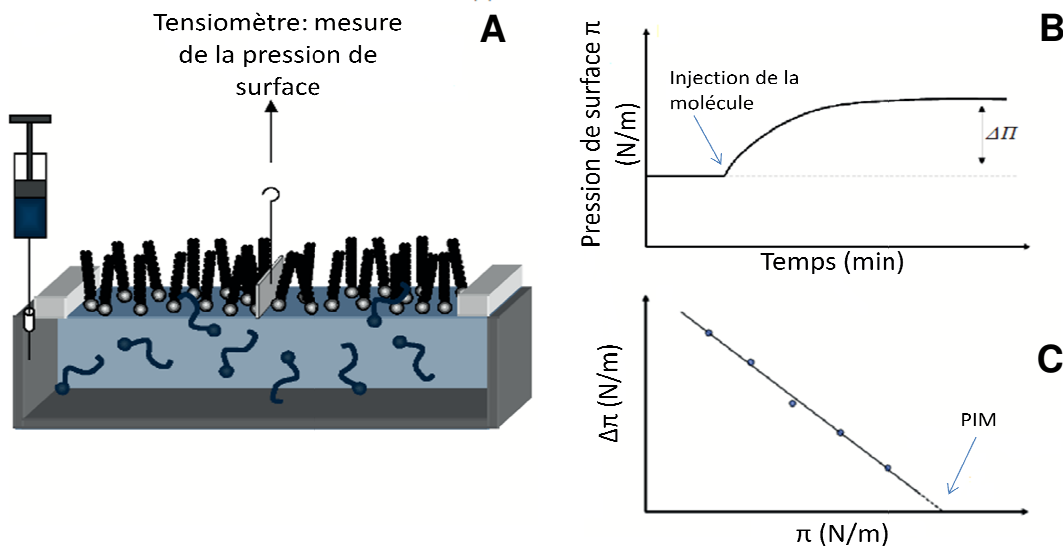


Figure 38. Principe de la technique de Langmuir utilisée pour évaluer la capacité de pénétration d'une molécule dans une monocouche lipidique

Dispositif utilisé pour mesurer la tension de surface (A) : Les lipides sont déposés à l'interface air/eau. Des barrières mobiles sont utilisées pour comprimer/décompresser la monocouche à une pression de surface définie. La molécule d'intérêt est injectée à l'aide d'une microseringue dans la sous-phase. Les variations de pression (dus à l'interaction de la molécule d'intérêt avec la monocouche) sont enregistrées au cours du temps (B). La représentation secondaire des variations de pression enregistrée en fonction de la pression de surface initiale (C) permet d'évaluer la capacité de pénétration de la molécule et d'en déduire la pression d'insertion maximale (PIM). D'après (Eeman & Deleu, 2010)

Puis, les variations de pression de surface (augmentations, la plupart du temps) sont enregistrées au cours du temps résultant donc de l'interaction de la molécule avec la monocouche lipidique (Figure 38 B). En traçant les différentes variations de pression de surface ($\Delta\pi$) observées en fonction des pressions de surface initiales correspondantes, une

pression d'insertion maximale (PIM) peut être déterminée, par extrapolation de la droite de corrélation (Figure 38 C).

II.2. Spectroscopie de fluorescence

Ces études ont été réalisées par Marie BESSE dans le cadre d'une collaboration entre nos deux thèses. Ses travaux sur la caractérisation des interactions des NPs de TiO₂ avec les interfaces biologiques nous ont apporté de précieuses informations quant à la perturbation de l'intégrité membranaire après exposition aux NPs de TiO₂.

II.2.1. Etude de la perméabilité membranaire

La capacité des NPs de TiO₂ à perméabiliser les membranes a été caractérisée par la mesure de la libération de la calcéine, une sonde fluorescente hydrophile, encapsulée dans des liposomes. Lorsque celle-ci se trouve à l'intérieur de vésicules lipidiques, sa concentration élevée conduit à son auto-extinction (quench) se traduisant par une faible émission de fluorescence. Si la membrane est perméabilisée, par ajout d'une molécule exogène, la calcéine est libérée dans le milieu. Par conséquent, cette dernière se retrouve alors diluée conduisant ainsi à une augmentation de l'intensité de fluorescence.

Des LUVs sont préparées à 1 mM par extrusion, comme décrit précédemment, dans du tampon TBS avec 35 mM de calcéine. La suspension de LUVs ainsi formée est séparée de la sonde libre, non encapsulée, par chromatographie d'exclusion sur une colonne de gel Sepharose 4B. Le tampon TBS est utilisé comme éluant et les fractions de liposomes, colorées par la calcéine, sont collectées. Un dosage des lipides des différentes fractions est réalisé selon la méthode de Stewart (Stewart, 1980). Les LUVs récoltées sont ensuite diluées à 10 µM final dans le tampon TBS et sont incubées pendant 30 minutes avec différentes concentrations de NPs de TiO₂ (de 10 à 200 µg/mL). L'intensité de fluorescence est mesurée, à 21°C, à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence (Varian Cary Eclipse) dont les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont de 520 et 490 nm, respectivement. Le pourcentage de libération de la calcéine est calculé par la relation suivante :

$$\% \text{ calcéine libérée} = \frac{I_{em} - I_i}{I_{tot} - I_i} \times 100$$

Où I_{em} est l'intensité de fluorescence mesurée après ajout des NPs, I_i , l'intensité de fluorescence initiale et I_{tot} , l'intensité de fluorescence totale obtenue après lyse complète des liposomes par ajout de Triton X-100 à 1 % (v/v).

II.2.1.1. Dosage des lipides par la méthode Stewart

La concentration en lipides a été déterminée par la méthode de Stewart dont le principe repose sur la complexation du groupement phosphate des phospholipides avec le ferrothiocyanate d'ammonium (Stewart, 1980). Le réactif de Stewart est composé de 30,4 g de thiocyanate d'ammonium (NH_4SCN) et 27,03 g de chlorure ferrique hexahydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) dissous dans un litre d'eau distillée. 2 mL de chloroforme et 1mL de réactif sont ajoutés à chaque échantillon. Ceux-ci sont ensuite vortexés pendant une minute. L'absorbance de la phase chloroformique est mesurée à 488 nm et la concentration est déduite de la droite étalon réalisée à partir d'une solution de DPPC.

II.2.1.2. Pourcentage de liposomes adsorbés à la surface des NPs de TiO_2

Afin d'évaluer le taux d'adsorption des NPs de TiO_2 sur les vésicules lipidiques, des concentrations croissantes de 0 à 2 mg/L de NPs de TiO_2 sont incubées dans les suspensions de LUVs à 10 μM durant 30 min à température ambiante. La calcéïne est encapsulée préalablement dans les LUVs, pour la détection du signal. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 min à 13 000 RPM afin de faire culotter les NPs, entraînant avec elles les liposomes adsorbés à leur surface. Enfin, le surnageant est prélevé et est additionné de Triton X-100 à 1 % (v/v) afin de lyser les membranes des liposomes. La quantité de lipides étant directement proportionnelle à l'intensité de fluorescence après ajout de Triton X-100, le pourcentage de liposomes adsorbés sur les NPs de TiO_2 dans le culot est déduit à partir de l'équation suivante :

$$\% \text{ liposomes adsorbés} = \frac{I_{NPS}}{I_0} \times 100$$

Où I_{NPS} représente l'intensité de fluorescence du surnageant après ajout de Triton X-100 des échantillons contenant des NPs et, I_0 l'intensité de fluorescence du surnageant après ajout de Triton X-100 des échantillons sans NPs.

II.2.2. Etude de la fluidité des membranes

L'influence des NPs sur l'ordre des lipides membranaires a été évaluée grâce à deux molécules fluorescentes : Le Laurdan et le Prodan. Ces sondes, considérées comme des analogues lipidiques, ont la particularité de se répartir uniformément aussi bien dans les phases gels que fluides. L'intensité de fluorescence dépend de la présence de molécules d'eau dans leur environnement proche. En effet, au sein d'une membrane où les lipides sont très ordonnés (par exemple en phase gel), les molécules d'eau sont exclues, ce qui se traduit par une intensité de fluorescence importante du premier pic d'émission (435 ou 440 nm selon la sonde). A l'inverse, lorsque les lipides sont dans une configuration plutôt désordonnée (par exemple en phase fluide), les molécules d'eau sont capables de pénétrer dans la membrane induisant un maximum d'intensité au deuxième pic d'émission (490 ou 480 nm selon la sonde). A partir de là, Parasassi et son équipe ont pu définir un paramètre dit "polarisation généralisée" (*Generalized Polarization* en anglais, GP), reflétant niveau de compaction et donc d'ordre dans la membrane. Il est défini par la relation suivante (Parasassi et al, 1990) :

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$$

Où I_B correspond à l'intensité de fluorescence à 435 ou 440 nm (premier pic d'émission) et I_R à l'intensité de fluorescence à 490 ou 480 nm (deuxième pic d'émission) respectivement pour le Laurdan et le Prodan., la longueur d'onde d'excitation étant de 360 nm pour les deux sondes.

Les sondes utilisées dans ce travail possèdent toutes deux un groupement naphthalène, mais diffèrent par la longueur de leur chaîne alkyle. Ainsi, le Prodan, à la chaîne plus courte, s'insère au niveau des têtes polaires, alors que le Laurdan, lui, s'ancre plus profondément dans la membrane (Figure 39).

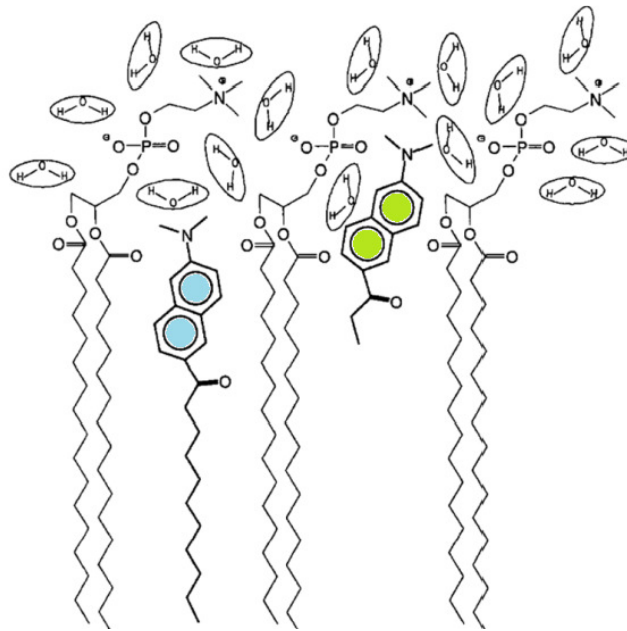


Figure 39. Localisation des sondes Laurdan et Prodan dans un feuillet lipidique.

Le Laurdan, (en bleu) à gauche, s'insère juste sous le squelette de glycérol au niveau de la partie hydrophobe alors que le Prodan, (en vert) à droite, est localisé au niveau de la tête hydrophile. D'après (Parasassi et al, 1998)

Les GPs du Laurdan et du Prodan ont été mesurés dans des SUVs de différentes compositions et à différentes températures. Pour cela, les sondes fluorescentes sont ajoutées à la solution chloroformique de lipides avant séchage. Les mélanges de SUVs/Prodan et de SUVs/Laurdan sont préparés à un ratio 110:3 et 110:1 (mol/mol) respectivement, selon la méthode de préparation décrite précédemment. Afin d'évaluer les variations de fluidité membranaire induites par la présence de NPs, le GP de chaque sonde est mesuré en présence de NPs d'anatase à différentes concentrations (de 0 à 200 $\mu\text{g/mL}$). Les échantillons sont incubés dans un bain-marie à des températures croissantes de 10°C à 70°C. Les mesures sont effectuées avec un spectrophotomètre de fluorescence (Varian Cary Eclipse) équipé d'un thermorégulateur. Les échantillons sont excités à 360 nm ; l'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde d'émission à 435 et 490 nm pour le Laurdan et à 440 et 480 nm pour le Prodan.

II.3. AFM

L'appareil utilisé dans ce travail est un microscope Multimode piloté par un contrôleur Nanoscope III (Digital Instrument, Bruker). Il est équipé d'un scanner J (125 μm x 125 μm x 5 μm). Les images de topographie (256 x 256 pixels) sont réalisées avec les microleviers 1 et

2 de pointes AFM ayant des microleviers de forme de V en nitrure de silicium (Si_3N_4) (Microlevers, brucker). Ceux-ci possèdent une constante de raideur théorique respective de 0.01 et 0.03 N/m et un rayon de courbure de l'ordre de 20 nm. Une cellule fluide en quartz, logeant la pointe, est employée afin de travailler en milieu liquide. Les images brutes générées sont traitées par le logiciel nanoscope 5.31r1 (aplanissement d'ordre 3) et sont présentées en nuances de gris (échelle linéaire). Les zones les plus claires de l'image correspondent aux zones les plus hautes de la surface, et inversement.

II.3.1. Observations de l'effet de différents paramètres sur la topographie des SLBs

Dans cette partie du travail, nous avons utilisé l'AFM pour visualiser, à l'échelle nanométrique, l'influence de la température de fusion ou encore du pourcentage de lipides saturés/insaturés sur la morphologie des assemblages lipidiques de membranes de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Les images de hauteur sont acquises en mode contact avec une vitesse de scan de 5 Hz.

II.3.2. Suivi en temps réel de l'interaction de l'hématine avec des SLBs

L'étude en temps réel de l'interaction de l'hématine avec des SLBs de DOPC/DPPC a été réalisée par AFM. Les SLBs sont obtenues par fusion à 60°C pendant 45 minutes (cf. Tableau 6) de SUVs de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) sur des surfaces de mica fraîchement clivées. Les bicouches formées sont imagées à 21°C jusqu'à 4 jours après leur préparation. Une première image est acquise ($t=0$) avant l'injection de la solution d'hématine (avec ou sans CQ) directement sur l'échantillon en évitant le démouillage de celui-ci. Des images de la même zone à différents temps d'incubation sont réalisées montrant l'évolution de la bicouche. Alors que la même zone de l'échantillon est sollicitée pendant l'imagerie, la force d'appui de la pointe sur l'échantillon doit être rigoureusement contrôlée (< 200 pN) et minimisée à chaque acquisition d'image. Les images de hauteur sont acquises en mode contact avec une vitesse de scan de 5 Hz.

II.3.3. Visualisation de l'effet des NPs de TiO₂ sur les SLBs biomimétiques

Dans cette partie, les bicouches lipidiques utilisées représentent des mimes de membranes cellulaires et des mimes de vésicules lipidiques du surfactant pulmonaire. Les SLBs de différentes compositions sont obtenues par fusion de SUVs, sous conditions spécifiques (Tableau 6), sur des surfaces de mica fraîchement clivées. Après l'acquisition de l'image à $t = 0$, les SLBs sont incubées au moins 30 minutes avec une suspension de NPs d'anatase avant d'être rincées puis imagées de nouveau sur la même zone. Afin d'éviter l'altération de la zone du scan, pouvant être provoquée par l'ajout des NPs ou les étapes de rinçage, il est nécessaire de contrôler la force d'appui de la pointe (< 200 pN). Les images de topographie des échantillons sont acquises en mode contact avec une vitesse de scan de 5 à 6 Hz avant injection, et de 6 à 8 Hz après injection, pour minimiser la force d'appui sur la membrane.

Chapitre III. Préparation de l'hématine et formation de la β -hématine

III.1. Préparation de l'hématine et de la CQ

L'hématine est préparée à une concentration de 3,5 mM en solubilisant la poudre d'hémine (Sigma Aldrich), pure à plus de 98%, dans une solution de NaOH à 0,1 M. La concentration est ensuite corrigée par mesure de l'absorbance à 385 nm en utilisant le coefficient d'extinction décrit par (Ginsburg & Demel, 1983) : $6,1 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La Chloroquine (CQ), quant à elle, provient également de chez Sigma Aldrich (pureté supérieure à 98 %) et est solubilisée dans l'eau ultra pure (ayant une résistivité de 18,2 M Ω).

III.2. Dosage de l'hématine

Cette partie a été réalisée par Slim AZOUZI dans le cadre d'une collaboration entre nos deux thèses. Ses travaux sur la caractérisation des interactions de molécules antipaludiques avec des systèmes membranaires biomimétiques nous ont permis notamment de quantifier l'hémine libre.

La distinction entre l'hématine et la β -hématine a été largement étudiée par Egan et ses collaborateurs. Ils ont notamment mis en place le test « pyridine-hemichrome assay », baptisé Phi β -assay, utilisant la pyridine pour doser l'hémine libre (Ncokazi & Egan, 2005). La complexation sélective de la pyridine avec l'hématine dépend de plusieurs facteurs. Le pH doit être en-dessous de 7,5 pour permettre la formation du complexe pyridine-hématine et la concentration de pyridine ne doit pas être trop élevée afin d'éviter qu'elle ne s'insère entre les dimères de la β -hématine. Dans ces conditions, deux molécules de pyridine se lient à l'hématine entraînant un déplacement du maxima de la bande de Soret de l'hématine de 15 nm, qui passe de 389 à 405 nm. Le complexe pyridine-hématine, de couleur rouge, présentant un maxima du pic d'absorption à 405 nm, est détecté.

La synthèse de la β -hématine, fondée sur les conditions proposées par le Phi β -assay (Ncokazi & Egan, 2005), est effectuée à partir d'hémine bovine. Une solution mère d'hématine est tout d'abord préparée comme décrit précédemment. Dans une série de tubes, 2 μ L de solution de HCl à 1 M et 6 μ L de H₂O sont introduits. Les tubes sont placés dans l'étuve à 60°C puis 11,7 μ L d'une solution d'acétate de sodium à 12,9 M, pré-incubée également à 60°C sont ajoutés. Le processus de polymérisation de la β -hématine est initié par l'addition de 20,3 μ L de la solution mère d'hématine préparée précédemment. Les tubes sont finalement incubés à 60°C pendant différents temps. Après incubation, la réaction est stoppée par ajout de tampon HEPES contenant 5 % de pyridine (v/v) (Ncokazi & Egan, 2005). L'absorbance est mesurée à 405 nm avec un spectrophotomètre (Hewlett Packard). Afin d'étudier l'effet des liposomes sur la cinétique de polymérisation d'hématine, des SUVs de compositions différentes ont été préparées dans l'eau ultrapure. Ces SUVs sont introduites dans le milieu de polymérisation à une concentration finale de 0,5 ou 1 mM.

Nous avons utilisé la technique Phi β -assay décrite précédemment pour mesurer le pouvoir d'inhibition de la CQ sur la polymérisation de l'hématine. Pour cela, les 6 μ L d'H₂O du protocole sont remplacés par 6 μ L de la solution de CQ.

Chapitre IV. Caractérisation des nanoparticules de dioxyde de titane

IV.1. Choix des nanoparticules de TiO₂

Notre choix s'est porté sur des NPs d'anatase (Titanium (IV) oxide, anatase, nanopowder, Sigma Aldrich) largement utilisées dans l'industrie. Sous forme de poudre sèche, elles mesurent moins de 25 nm de diamètre, avec une surface spécifique de 200-220 m²/g et une densité de 3,9 g/mL à 25°C (données fournisseur). L'utilisation de ce type de NPs a été suggérée notamment pour l'élaboration de biomatériaux de l'ingénierie osseuse et dentaire (Gerhardt et al, 2007; Xia et al, 2008). De plus, elles sont employées dans de nombreuses industries pour leurs propriétés catalytiques (fabrication de surfaces autonettoyantes (Fateh et al, 2011; Wu et al, 2007), retraitement de l'air et de l'eau (Álvarez et al, 2010; Puddu et al, 2010)). A l'heure actuelle, elles sont également étudiées pour l'élaboration de cellules photosensibles des panneaux solaires (Faustini et al, 2010; Kalyanasundaram & Graetzel, 2010).

Les NPs de TiO₂ sous forme de poudre sont hautement volatiles. Ainsi, pour éviter tous risques d'inhalation, elles sont prélevées et pesées dans une enceinte hermétiquement close (Precise™ HEPA-Filtered Glove Box 5220220, Labconco) puis conservées à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'à leur utilisation. La mise en suspension des NPs, effectuée sous une hotte à aspiration, se fait par ajout de tampon TBS pour atteindre une concentration finale de 1 mg/mL. La suspension de NPs d'anatase est ensuite soniquée 15 min puis agitée mécaniquement (vortex) avant de subir les différentes dilutions. Les NPs de TiO₂, sédimentant très rapidement, sont agitées avant chaque manipulation. Après utilisation, les déchets liquides sont filtrés à travers des membranes poreuses (0,4 µm puis de 0,2 µm) avant d'être déversés dans les éviers. Les déchets solides (flacons de pesée, filtres, cuves pour DLS...) sont récoltés dans des sachets hermétiquement refermables puis, ne disposant pas de circuit de recyclage particulier, sont jetés dans les poubelles.

IV.2. Caractérisation physico-chimique des NPs de TiO₂

La caractérisation des NPs de TiO₂ ont été réalisées par Marie BESSE, dans le cadre d'une collaboration entre nos deux thèses.

IV.2.1. Mesure de taille en solution par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering* en anglais, DLS) afin de déterminer les tailles des NPs de TiO₂ en suspension. Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement Brownien des particules en suspension. Un rayon laser, parcourant l'échantillon, est récupéré par un détecteur placé à un certain angle par rapport à l'axe du rayon source. Le déplacement des particules en suspension engendre des variations d'intensité de la lumière diffusée. Ces fluctuations sont traitées par un corrélateur numérique qui détermine alors la fonction d'auto-corrélation de l'intensité. Cette fonction représente la probabilité pour une particule de se trouver à un instant $t + dt$ au même point de l'espace qu'à l'instant t et permet de déduire le coefficient de diffusion (D) des particules. Ainsi, plus la particule est petite, plus elle présente un mouvement brownien important, et plus cette probabilité est faible. Enfin, le traitement mathématique de la fonction d'auto-corrélation permet donc d'obtenir la distribution de taille des particules (Urban & Schurtenberger, 1998).

Dans notre étude, nous avons utilisé la DLS pour mesurer la charge électrique globale ainsi que la taille des agrégats de NPs de TiO₂ en suspension avec l'appareil Zetasizer nano (Malvern Instrument), équipé d'une source laser de 633 nm et d'un détecteur à 90°. Les mesures sont réalisées à température ambiante (21°C).

IV.2.1.1 Charge et agrégation (potentiel-zéta)

Le potentiel-zéta représente le potentiel électrique à l'interface des deux couches ioniques entourant les particules et est relatif à la charge électrique globale de celles-ci. La valeur absolue du potentiel-zéta est révélatrice de leur stabilité en solution : ainsi, pour des valeurs comprises entre de 0 et 5 mV, les particules auront tendance à coaguler ou à s'agréger rapidement alors qu'au-delà de 60 mV, elles seront extrêmement stables. Le potentiel-zéta peut se mesurer en évaluant la mobilité électrophorétique des particules, c'est-à-dire leur

déplacement lorsqu'un champ électrique est appliqué à travers la suspension. Le potentiel-zéta des NPs d'anatase, suspendues dans un tampon TBS à pH 7,4, est de $-1,8 \pm 0,7$ mV. D'après cette valeur, nous pouvons en déduire que les NPs de TiO_2 étudiées sont donc globalement chargées négativement, sont peu stables et s'agrègent fortement.

1.2.1.2 Taille des agrégats

La taille des agrégats des NPs de TiO_2 en suspension est un paramètre critique car la taille de ces particules conditionne directement leurs propriétés physico-chimiques. Nous avons donc déterminé la taille des agrégats de NPs de TiO_2 en suspension dans le tampon TBS à pH 7,4, par DLS. D'après le principe de la DLS, détaillé en amont, le rayon hydrodynamique des agrégats de NPs peut être calculé grâce à la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k T}{6\pi \eta D}$$

Où, k représente la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du milieu et D le coefficient de diffusion. D'après l'équation de Stokes-Einstein, les petites particules diffusent plus rapidement que les grosses particules.

IV.2.2. Mesure des taille par microscopie électronique à balayage (MEB)

Les mesures de taille, effectuées en MEB, nous ont permis non seulement de comparer les tailles d'agrégats obtenues par DLS mais aussi de visualiser directement la morphologie de ces agrégats en présence ou en absence de vésicules lipidiques. L'imagerie par MEB consiste à bombarder d'électrons un échantillon en balayant sa surface qui, en réponse, va réémettre des électrons secondaires. Ceux-ci, sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. Une image en trois dimensions de la surface est alors reconstruite. L'appareil utilisé permet de travailler dans un mode «environnemental», autrement dit, d'observer des échantillons biologiques sans les déshydrater totalement. Nos images ont donc été réalisées en mode «environnemental» (2°C ; 4 à 4,7 mbar) avec un FEG XL30 (Philips).

En ce qui concerne le protocole de préparation des échantillons, une suspension contenant 1,5 mM de SUVs et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs a été mélangée à 5 μM de glucose. Ce dernier est ajouté afin de préserver la structure des membranes. Ensuite, 40 μL de ce mélange sont déposés sur

des supports d'acier et sont incubés 1h à température ambiante (21°C), à l'abri de la lumière. Les échantillons sont enfin trempés dans 3 « bains » successifs remplis d'eau ultrapure (à 18,2 MΩ) afin d'éliminer les sels, avant d'être doucement séchés sous flux d'azote. Après l'acquisition des images, celles-ci sont traitées grâce au logiciel Image J afin d'évaluer le diamètre des agrégats/agglomérats de NPs. La distribution des tailles des NPs est enfin tracée, par intervalle de 100 nm, et les différentes populations sont identifiées par lissage des histogrammes (courbes de Gauss), réalisés avec le logiciel OriginPro 5.1.

Résultats

Chapitre I. Modulation de la structure des membranes

Les SLBs sont des modèles de choix pour mimer les membranes biologiques. On peut ainsi observer par AFM, l'organisation des lipides à l'échelle nanométrique et en conditions proches des conditions physiologiques.

La méthode utilisée dans ce travail, pour générer ces SLBs, est la méthode de fusion des vésicules (Tamm & McConnell, 1985). Ce processus s'établit dans des conditions précises (pH, température, force ionique...). Comme détaillé dans la partie Matériels et méthodes, chapitre I.4, les liposomes sont déposés sur une surface de mica fraîchement clivée. Au contact de ce support, les vésicules lipidiques se déforment jusqu'à leur rupture pour former une SLB.

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à caractériser des modèles membranaires supportés simples, en système binaire, largement utilisés dans la littérature (Choucair et al, 2007; Giocondi et al, 2001; Leonenko et al, 2004). En étudiant l'influence de certains paramètres, par visualisation à l'AFM, nous avons pu observer les changements morphologiques des membranes lipidiques ainsi formées. Ces modèles ont ensuite été utilisés pour l'étude des interactions avec des agents exogènes.

I.1. Influence de la température de fusion

Beaucoup d'auteurs se sont intéressés à l'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques sur la morphologie membranaire, comme la force ionique (Seeger et al, 2009), la concentration en calcium (Ca^{2+}) ou encore la nature du support (Richter & Brisson, 2005; Seeger et al, 2010).

La température est un autre paramètre critique qui doit être contrôlé du début du processus jusqu'à l'acquisition d'images par AFM. En effet, beaucoup de travaux ont étudié l'influence de ce facteur sur la morphologie des membranes, sur la nucléation des domaines dans des mélanges binaires (Blanchette et al, 2008a; Giocondi et al, 2001), sur la formation de domaines asymétriques (Lin et al, 2006; Wacklin, 2011), ou encore sur la visualisation de la nucléation de domaines.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux. Nous nous sommes proposés de moduler la température lors du processus de fusion puis de visualiser les changements de topographie des membranes formées. Pour ce faire nous avons préparé des SLBs de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) en faisant varier la température de fusion, de 21°C à 60°C. Après rinçage des surfaces (voir Matériels et méthodes, chapitre I.4), la température est abaissée doucement ($\sim 0,2$ °C/min) jusqu'à atteindre la température ambiante (21°C). Tous les échantillons sont ensuite imagés à cette température. La Figure 40 présente les images caractéristiques de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 obtenues à différentes températures de fusion. Nous pouvons tout d'abord distinguer la présence de deux niveaux de gris : les domaines en phase gel, en clairs, enrichis en DPPC sont entourés de phase fluide enrichie en DOPC, qui apparaît en foncé. La différence de hauteur entre les deux phases est de $(1,0 \pm 0,1)$ nm et cela quelle que soit la température de fusion testée, suggérant une absence d'asymétrie membranaire. En s'intéressant à la morphologie des domaines de DPPC à différentes températures, nous avons pu observer à des températures inférieures à 40°C, que les domaines apparaissent plutôt petits (diamètres variant de 0,3 à 1,5 μm), de forme ronde et au contour régulier (Figure 40, A-D). Au contraire, à une température proche ou supérieure à 40°C, les domaines formés sont gros avec une forme multilobée caractéristique (Bernchou et al, 2009a; Bernchou et al, 2009b) (Figure 40, E-J). Les diamètres des domaines sont très dispersés et oscillent entre 20 μm et 50 μm .

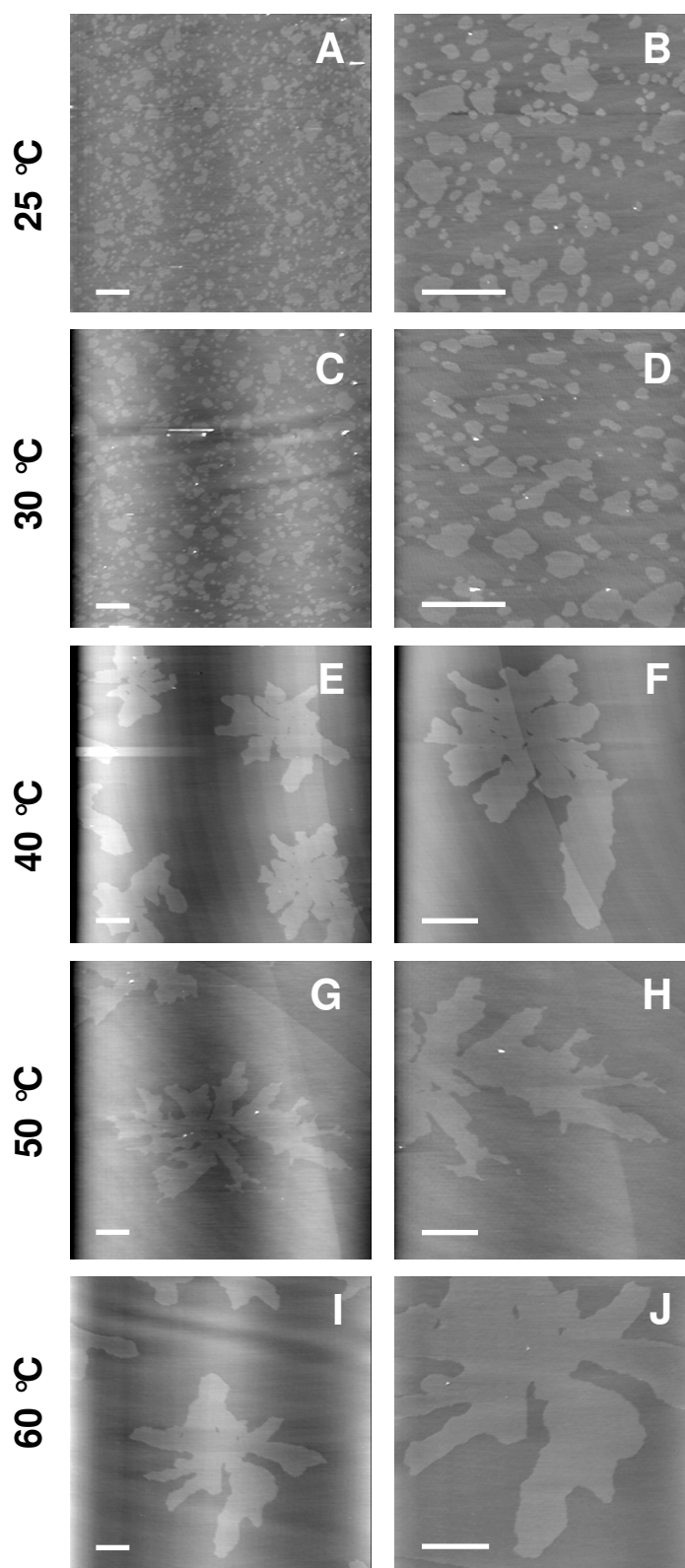


Figure 40. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) préparées à différentes températures de fusion.

Les échantillons sont fusionnés à différentes températures pendant 45 minutes. Les membranes sont imagées le lendemain à 21°C. Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, ces expérimentations ont été réalisées en triplicata. Chaque image est représentative de 3 autres zones imagées. Barre d'échelle = 5µm, échelle en z = 10 nm.

RESULTATS

Chapitre I. Modulation de la structure des membranes

Afin d'examiner plus finement ces résultats et notamment d'analyser la distribution des tailles des domaines de DPPC, nous avons mesuré les aires et les périmètres de ces domaines sur 3 expérimentations différentes (chaque expérimentation comptabilisant les mesures sur au minimum 3 zones). Ainsi, pour les températures de fusion inférieures à 40°C, l'analyse s'est portée sur au moins 680 domaines et à températures égales ou supérieures à 40°C, au moins 30 domaines ont été pris en compte. La distribution des tailles a donc été réalisée pour chaque température. La Figure 41 présente les histogrammes de distribution des aires et des périmètres pour 3 conditions caractéristiques : une température basse (25°C), une température haute (50°C) ainsi qu'une température intermédiaire (40°C).

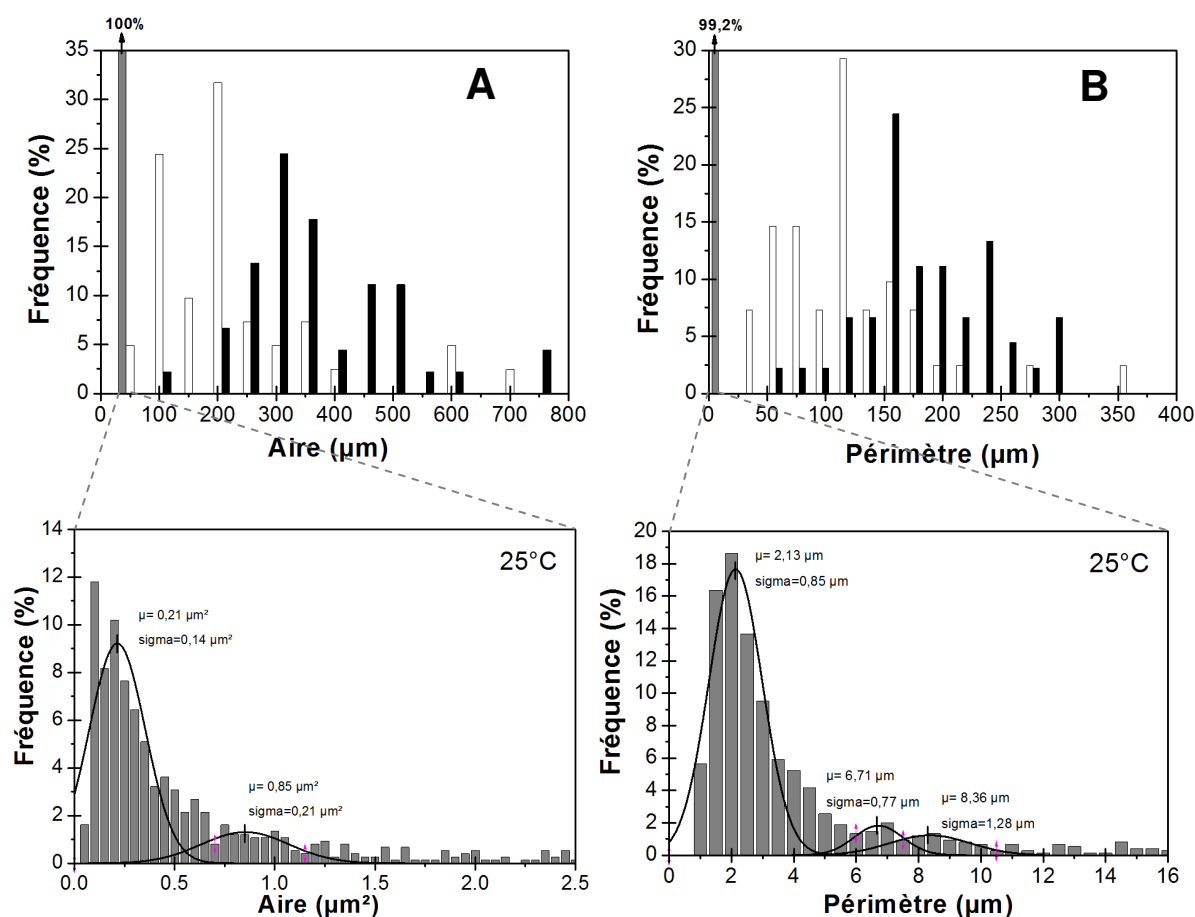


Figure 41. Histogrammes des distributions d'aires et de périmètres des domaines de DPPC.

Les images AFM sont traitées avec le logiciel Image J pour mesurer l'aire (A) et le périmètre (B) de chaque domaine de DPPC. 3 températures sont représentées ici : température basse (25°C, barres grises), température haute (50°C, barres noires) et température intermédiaire (40°C, barres blanches). Pour la distribution des tailles à 25°C, l'échelle n'est pas adaptée puisque nous ne pouvons voir qu'une unique barre de fréquence à plus de 99 %. L'historgramme en dessous permet de visualiser la distribution des tailles (aires et périmètres) pour la température de fusion de 25°C avec une échelle adéquate. Sur chaque histogramme de distribution, les différentes populations sont identifiées puis lissées par une courbe de Gauss.

Sur cette figure, nous pouvons voir que les distributions d'aires et de périmètres des domaines varient très fortement de $0,2 \mu\text{m}^2$ à $300 \mu\text{m}^2$ pour les aires et de $2 \mu\text{m}$ à $150 \mu\text{m}$ pour les périmètres. Une autre échelle a dû être utilisée pour l'analyse à 25°C afin de se rendre compte de l'existence de plusieurs populations. En effet, si nous analysons plus en détail les distributions des aires des domaines fusionnés à 25°C , nous pouvons observer deux populations : un pic majoritaire à $(0,21 \pm 0,14) \mu\text{m}^2$ et un pic minoritaire plus large à $(0,85 \pm 0,21) \mu\text{m}^2$. De même, nous pouvons déduire trois populations pour les distributions des périmètres : un pic majoritaire à $(2,13 \pm 0,85) \mu\text{m}$ et deux pics mineurs à $(6,71 \pm 0,77) \mu\text{m}$ et $(8,36 \pm 1,28) \mu\text{m}$.

Ainsi, pour chaque histogramme de distribution d'aire et de périmètre, le pic majoritaire est identifié. La valeur de ce dernier est ensuite tracée en fonction de la température de fusion des SLBs (Figure 42 A et B). Sur la Figure 42, nous pouvons observer que les points expérimentaux, tracés en fonction de la température de fusion, suivent une allure sigmoïdale qui est par la suite lissée, avec une courbe dose-réponse (en utilisant le logiciel OriginPro 8.5). Le point d'inflexion de la courbe est déterminé à $(39,7 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ et à $(38,6 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ pour l'aire et le périmètre, respectivement. Le point d'inflexion, traduisant la température critique de changement brutal de taille, se rapproche de la valeur de la température de transition de phase (T_m) de la DPPC, qui est de 41°C (Lentz et al, 1978). Ainsi, pour ces deux paramètres, il semblerait que le point d'inflexion soit déterminé par la T_m du lipide formant les phases gels, c'est-à-dire la DPPC. A partir de ces résultats, un autre paramètre a été calculé : le « Shape factor », S . Celui-ci est défini par l'équation suivante (Blanchette et al, 2008b) :

$$S = \frac{P^2}{4\pi \times A}$$

Où P désigne le périmètre et A , l'aire.

Comme décrit dans les travaux de Blanchette, le « Shape factor », traduit le régime de croissance du domaine. En effet, la valeur de S , évaluée par la mesure des aires et des périmètres des domaines, peut être corrélée au régime de croissance du domaine. La croissance d'un domaine suit deux étapes : d'abord la diffusion du lipide jusqu'à la périphérie du domaine puis le « rattachement » de celui-ci au domaine. Si la première étape est limitante, on parle alors de diffusion limitée, se traduisant par $S < 1,2$. Si au contraire, la deuxième étape est limitante, c'est la réaction qui sera limitée, avec $S > 4$. Enfin, lorsque S est compris entre

1,2 et 4, aucune étape n'est limitante, on parle alors de diffusion + réaction. Le calcul de ce paramètre peut donc nous éclairer sur les phénomènes moléculaires, de diffusion et de réaction qui se passe pendant l'étape de fusion et d'équilibrage (après le rinçage des membranes).

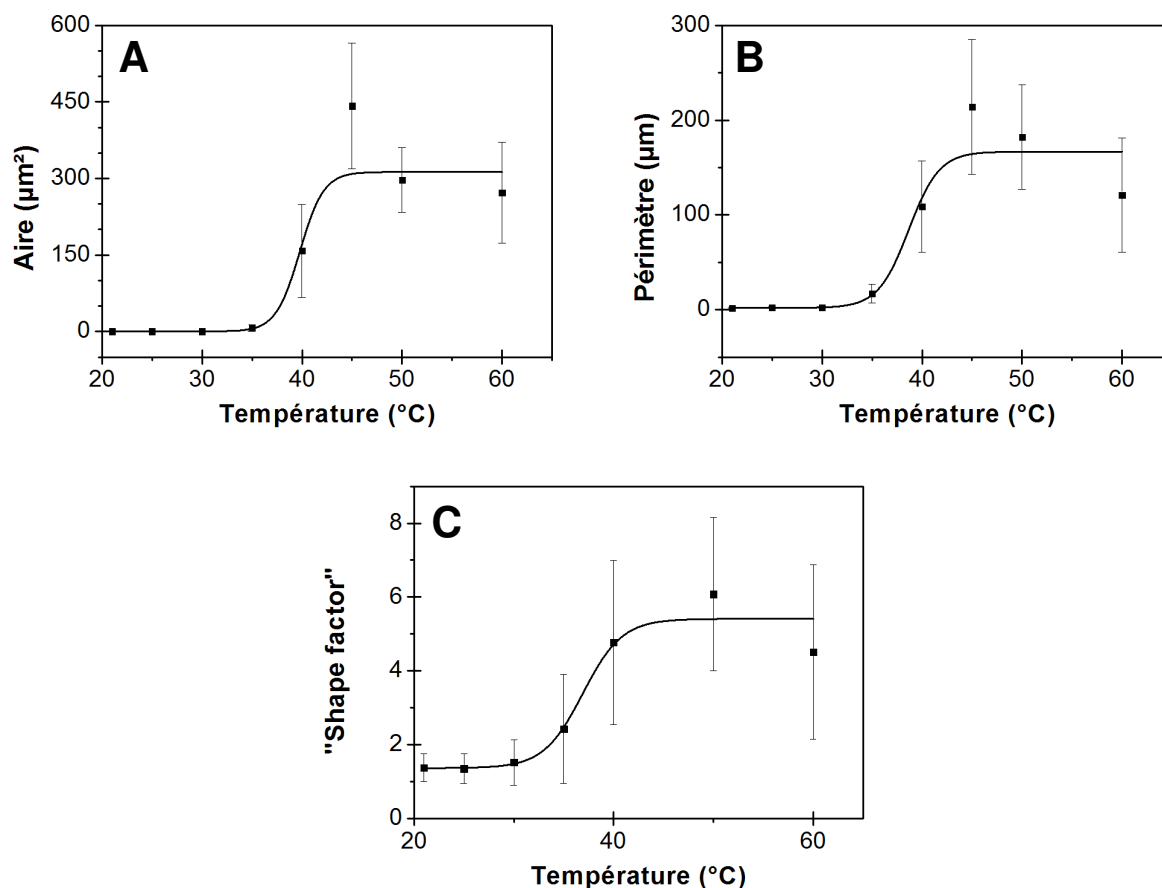


Figure 42. Influence de la température de fusion sur la taille des domaines de DPPC

Mesure de l'aire (A), du périmètre (B) et calcul du "Shape factor" en fonction de la température de fusion. Chaque point expérimental correspond au maximum de la gaussienne majoritaire avec pour chaque point l'écart-type correspondant, $\sigma = 1/A \times (2\pi)^2$ où A représente le maximum de la courbe de Gauss.

Les points expérimentaux sont lissés avec une courbe de dose-réponse, également issue du logiciel OriginPro 8.5 dont l'équation est la suivante : $y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(log_{x_0} - x)p}}$ où A_1 et A_2 sont les asymptotes minimum et maximum respectivement, log_{x_0} indique l'abscisse au point d'inflexion et p représente la pente de Hill.

Sur la Figure 42 C, nous pouvons observer que S suit également une sigmoïde, augmentant de $1,3 \pm 0,1$ à $5,4 \pm 0,4$, respectivement pour les basses et hautes températures. Si nous nous fondons sur le raisonnement de Blanchette (Blanchette et al, 2008b), pour des températures inférieures à 30°C, la croissance des domaines de DPPC suivrait un processus de réaction + diffusion. Au contraire, lorsque la température dépasse la T_m de la DPPC, les domaines

adoptent une morphologie plus irrégulière, voire fractale avec un S significativement plus élevé, proche de 5, qui indiquerait que la croissance des domaines de DPPC suivrait le processus de diffusion limitée. Nous pourrions alors identifier deux régimes de croissances : réaction + diffusion pour les basses températures (20 - 30°C) et réaction limitée pour les hautes températures (50 - 60°C). Cependant, les travaux de Blanchette ont été menés dans des conditions différentes des nôtres. En effet, le calcul de ce S , a été réalisé sur des membranes, toutes chauffées au dessus de la T_m , ne faisant varier que la température d'acquisition des images, alors que nos échantillons ont tous été imagés à 21°C. En ce sens, la valeur stricto sensu de S n'est pas absolue, mais donne plutôt une indication sur ce qu'il se passe à l'échelle moléculaire. A partir de ce constat, nous pouvons interpréter nos résultats. Pour des températures élevées, dépassant la T_m du DPPC, les molécules lipidiques constituant la bicouche, sont très mobiles et donc la diffusion n'est évidemment pas l'étape limitante. Ainsi, la croissance des domaines serait plutôt régie par la fixation des lipides à ceux-ci, donnant cette forme caractéristique aux domaines de DPPC qui apparaissent multilobés. A l'inverse, pour des températures basses, ne dépassant pas la T_m , les molécules de DPPC, en phase gel, sont très compactées avec une structure rigidifiée, rendant leur diffusion limitée et plus lente. Le S proche de 1, corrobore cette hypothèse.

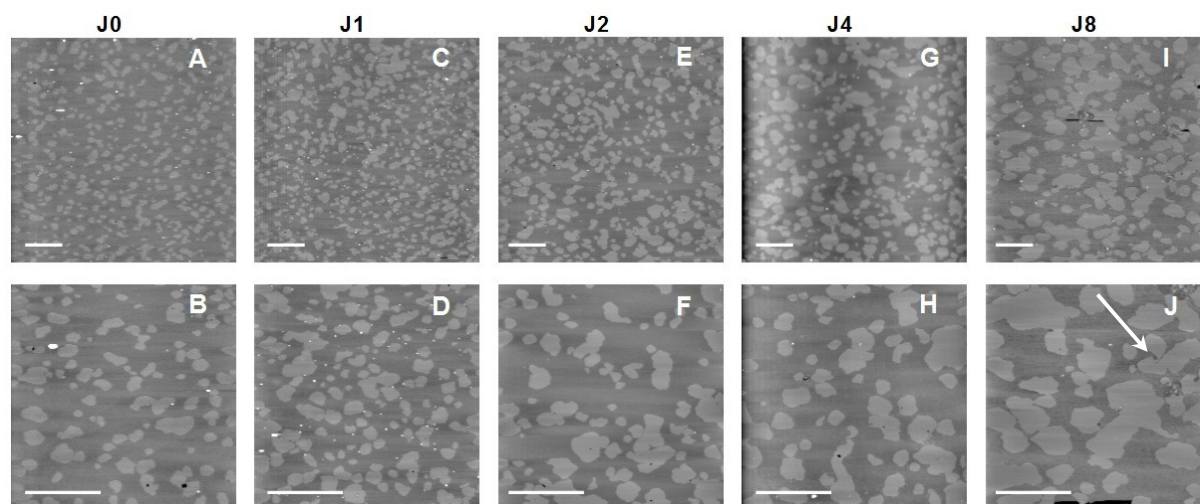


Figure 43. Suivi dans le temps de la taille des domaines de DPPC d'une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire)

Les échantillons sont d'abord fusionnés à 21°C pendant 45 minutes. Les membranes sont ensuite imagées à différents temps après l'arrêt de la fusion : les échantillons sont imagés immédiatement après rinçage (J0, A-B), puis 19 heures (J1, C-D), 43 heures (J2, E-F), 91 heures (J4, G-H), et enfin 283 heures (J8, I-J) après rinçage. La flèche blanche montre la coalescence de plusieurs domaines. Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, ces expérimentations ont été réalisées en triplicata. Chaque image est représentative de 3 autres zones imagées. Barre d'échelle = 5µm, échelle en z = 10 nm.

Pour valider notre raisonnement, nous nous sommes proposés de réaliser trois expérimentations qui nous éclaireront sur ce point.

Nous nous sommes tout d'abord proposés de suivre l'évolution dans le temps d'une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) fusionnée à 21°C. Sur la Figure 43, nous pouvons observer la topographie caractéristique d'une bicouche mixte de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) imagée à J1 (C-D) dans les mêmes conditions que précédemment. Nous pouvons aussi noter que l'image acquise juste après arrêt de la fusion (J0) montre également des petits domaines de DPPC de l'ordre de 0,5-1 µm de diamètre, similaires à ceux observés à J1. Les domaines de DPPC apparaissent symétriques même juste après l'arrêt de la fusion ce qui est en contradiction avec les expérimentations de l'équipe de Choucair (Choucair et al, 2007). A J2, J4 et J8, nous pouvons observer une augmentation progressive de la taille des domaines de $(0,7 \pm 0,6) \mu\text{m}^2$ pour J0 à $(3,2 \pm 3,3) \mu\text{m}^2$ pour J8 (Figure 44). Les fortes valeurs des écarts-types dévoilent la diversité de taille des domaines mesurés.

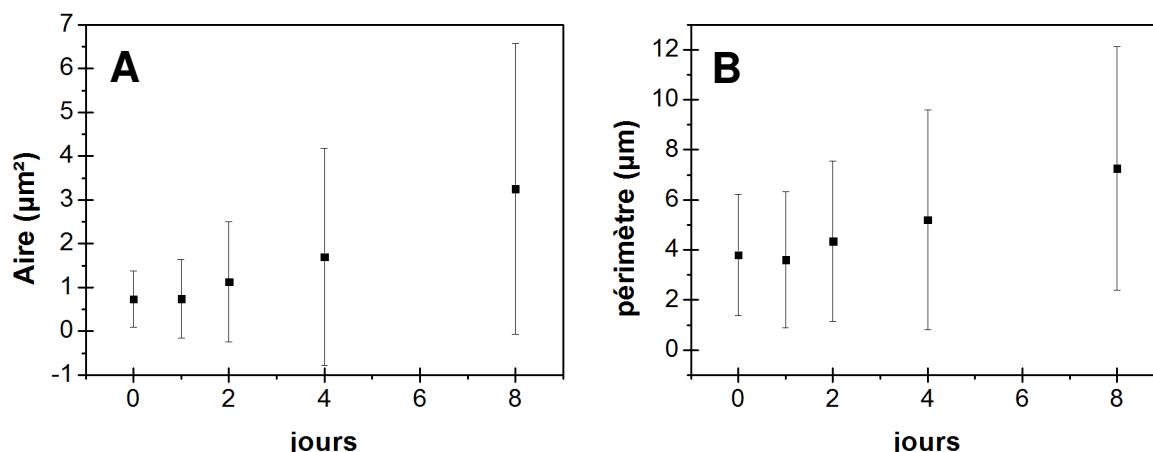


Figure 44. Evolution de la taille des domaines de DPPC en fonction du temps.

Mesure de l'aire (A) et du périmètre (B). Chaque point expérimental correspond à la moyenne des aires/périmètres mesurés pour chaque domaine. Les mesures ont été effectuées sur 3 zones du même échantillon.

Ces résultats montrent bien que lorsque la fusion des vésicules est réalisée à 21°C, la diffusion est bien l'étape limitante et que les lipides tentent d'atteindre un état métastable par coalescence de petits domaines (comme l'indique la flèche sur la Figure 43-J) mais sans jamais aboutir à de gros domaines multilobés.

A partir de ces observations, nous pouvons donc supposer que, durant l'étape de fusion, la température influencerait la mobilité des molécules de DPPC au sein de la bicouche. Comme

évoqué plus haut, à des températures supérieures à la T_m du DPPC, les lipides sont redistribués. Ainsi, les molécules de DPPC seraient capables de diffuser pour former de larges domaines, pendant l'étape de refroidissement, avant l'imagerie à l'AFM (Blanchette et al, 2008b). Afin de vérifier cette hypothèse, des SLBs, préparées à 21°C, sont chauffées à 60°C pendant 45 minutes. Après un refroidissement doux, ces mêmes membranes sont imagées (Figure 45). Nous remarquons alors que le franchissement de la barrière énergétique par chauffage de la bicouche, permet la diffusion rapide des molécules de DPPC se regroupant pour former ces larges domaines.

Un autre paramètre critique est à considérer pour prouver ce postulat : l'étape de refroidissement après arrêt de la fusion. En effet, beaucoup de travaux ont reporté l'importance de ce paramètre sur l'organisation des domaines au sein de la bicouche (Blanchette et al, 2006).

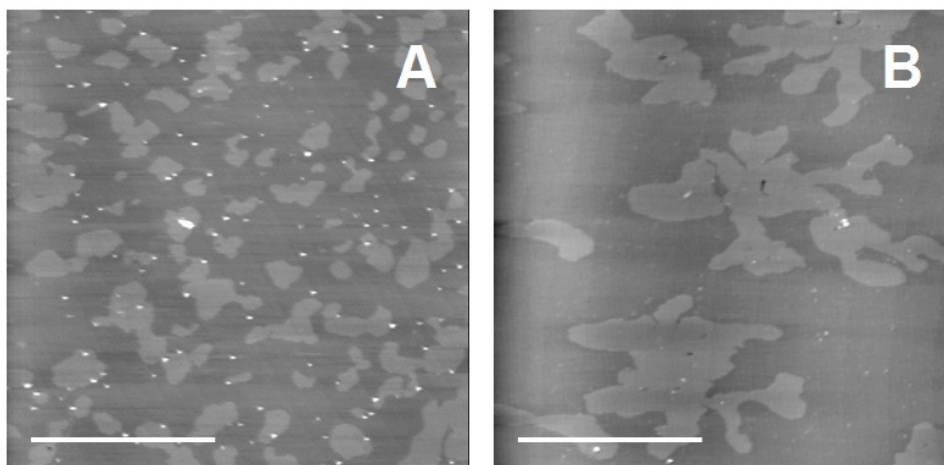


Figure 45. Images AFM d'une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 fusionnée à 21°C puis chauffée à 60°C
Les liposomes sont tout d'abord déposés sur la surface de mica à 21°C pendant 45 minutes. L'échantillon est stabilisé une nuit à 21°C avant d'être imagé (A). Puis, la membrane est chauffée à 60°C pendant 45 minutes. Après refroidissement doux pendant 4 heures jusqu'à 21°C, l'échantillon est de nouveau imagé par AFM (B). Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, cette expérimentation a été réalisée en triplicata. Barre d'échelle = 5µm, échelle en z = 10 nm.

Pour s'en rendre compte, nous avons préparé des bicouches à 60°C pendant 45 minutes qui ont été ensuite immédiatement immergées dans un grand volume de tampon de rinçage maintenu à 21°C afin de stopper le processus de fusion. La Figure 46 présente les images AFM des membranes obtenues après une nuit à 21°C. Nous pouvons observer que les domaines de DPPC obtenus sont plutôt petits (avec une aire de $(7 \pm 4) \mu\text{m}^2$).

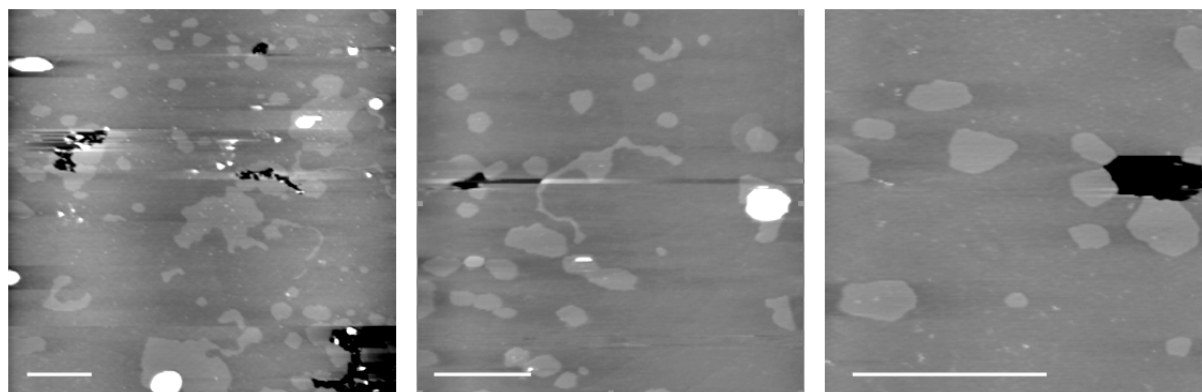


Figure 46. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) obtenues après un refroidissement brutal.

Les échantillons sont d'abord incubés à 60°C pendant 45 minutes. A la fin du temps d'incubation, ceux-ci sont immergés dans un grand volume de tampon TBS (~ 250 mL) maintenu à 21°C afin de provoquer un refroidissement quasi instantané de 60°C à 21°C. Les membranes sont gardées une nuit à 21°C avant d'être imagées. Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, l'imagerie de cette expérimentation a été réalisée en triplicata. Barre d'échelle = 5µm, échelle en z = 10 nm.

Ceci indique que le refroidissement brutal altère la mobilité des molécules de DPPC. Ainsi, les larges domaines multilobés ne sont pas formés instantanément mais le sont plutôt grâce à un processus lent de nucléation se déroulant lors de l'étape de refroidissement (Blanchette et al, 2006).

D'après la Figure 42, nous avons émis l'hypothèse que les points d'inflexion des sigmoïdes étaient régis par la T_m du lipide formant la phase gel, dans notre cas le DPPC. Afin de vérifier cette théorie, nous avons choisis un autre lipide proche de la DPPC mais différant par le nombre de carbones sur les chaînes aliphatiques : le DSPC (caractérisé par une T_m de 54,9°C). De la même manière, des SLBs de DOPC/DSPC 1:1 (ratio molaire) ont été préparées en faisant varier la température de fusion de 21°C à 70°C. Après rinçage des surfaces (voir Matériels et méthodes, chapitre I.4), la température a été abaissée doucement jusqu'à atteindre la température ambiante (21°C). Tous les échantillons ont ensuite été imagés à cette température. La Figure 47 présente les images caractéristiques de bicouches de DOPC/DSPC 1:1 (ratio molaire) obtenues à différentes températures de fusion. Ici aussi, nous pouvons noter la présence de deux niveaux de gris : les domaines en phase gel, en clairs, enrichis en DSPC sont surélevés de $1,3 \pm 0,1$ nm par rapport à la phase fluide enrichie en DOPC. Cette valeur est tout à fait cohérente puisque le DSPC possède 18 C au niveau des chaînes hydrophobes, alors que le DPPC n'en possède que 16, d'où la différence de hauteur de 0,2 nm par rapport au DOPC. Si l'on s'intéresse à la morphologie des domaines de DSPC à

différentes températures, nous pouvons observer qu'à des températures inférieures ou égales à 50°C, les domaines de DSPC apparaissent plutôt petits, aux contours réguliers (Figure 47, A-F). A l'inverse, à partir de 60°C, la taille des domaines de DSPC change significativement (Figure 47, G-J) d'un diamètre de 1-3 μm à 21°C, à 20-40 μm à 70°C. De même que pour la DPPC, nous avons examiné la distribution des tailles des domaines de DSPC pour chaque température et nous avons déterminé le pic majoritaire pour chaque condition. Puis nous avons tracé les valeurs d'aires et de périmètres en fonction de la température de fusion (Figure 48). Comme précédemment, nous pouvons observer que les points expérimentaux, tracés en fonction de la température de fusion, suivent une allure sigmoïdale. Après lissage par une courbe dose-réponse, le point d'inflexion a été déterminé à $(56,6 \pm 2,4)^\circ\text{C}$ et à $(54,1 \pm 2,8)^\circ\text{C}$ pour l'aire et le périmètre respectivement.

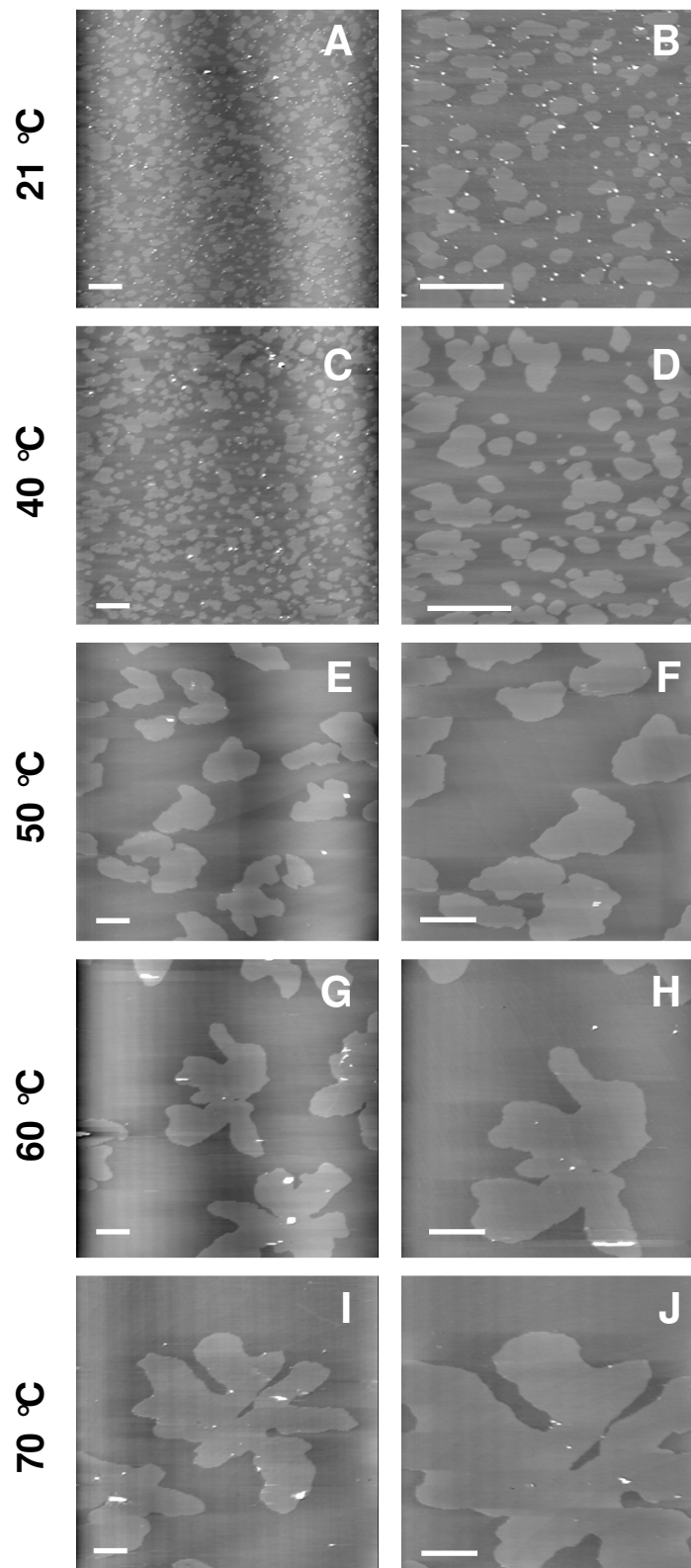


Figure 47. Images AFM de bicouches de DOPC/DSPC 1:1 (ratio molaire) préparées à différentes températures de fusion.

Les échantillons sont fusionnés à différentes températures pendant 90 minutes. Les membranes sont imagées le lendemain à 21°C. Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, ces expérimentations ont été réalisées en triplicata. Chaque image est représentative de 3 autres zones imagées. Barre d'échelle = 5µm, échelle en z = 10 nm

Là aussi, les valeurs sont très proches de la T_m du DSPC, 54,9°C (Lentz et al, 1978), le lipide formant les phases gels. Ainsi, grâce aux expériences complémentaires avec le DSPC nous avons pu mettre en évidence que la température de fusion est un paramètre intéressant pour moduler la taille et la forme des domaines en phase gel de compositions mixtes. Ainsi, outre les lois de diffusion des lipides au sein de la bicouche, régissant la morphologie des domaines, les températures de transition phase jouent également un rôle important sur la taille de ces domaines. En effet, lorsque la température de fusion est inférieure à la T_m du lipide formant les phases gels, les domaines auront une petite taille et un contour régulier. Alors que lorsque la température de fusion est supérieure à la T_m du lipide formant les phases gels, les domaines seront plus larges avec une forme caractéristique en forme de feuille.

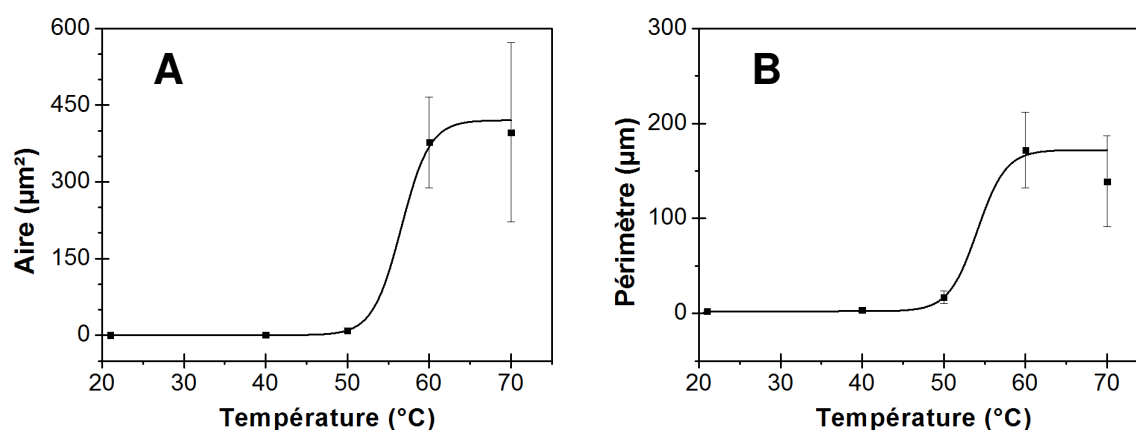


Figure 48. Influence de la température de fusion sur la taille des domaines de DSPC

Mesure de l'aire (A) et du périmètre (B) en fonction de la température de fusion. Chaque point expérimental correspond au maximum de la gaussienne majoritaire avec pour chaque point l'écart-type correspondant :

$\sigma = \frac{1}{A} \times (2\pi)^2$ où A représente le maximum de la courbe de Gauss. Les points expérimentaux sont lissés avec une courbe de dose-réponse issue du logiciel OriginPro 8.5 dont l'équation est la suivante :

$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(log_{x_0} - x)p}}$ où A_1 et A_2 sont respectivement, les asymptotes minimum et maximum, log_{x_0} indique l'abscisse au point d'inflexion et p représente la pente de Hill. Les aires et les périmètres des domaines en phase gel ont été mesurés sur 3 expérimentations différentes, sur au minimum 3 zones. Pour les températures de fusion inférieures ou égales à 50°C, l'analyse s'est portée sur au moins 113 domaines et à températures supérieures à 50°C, au moins 17 domaines ont été pris en compte

I.2. Influence du pourcentage lipides saturés/lipides insaturés

Dans la partie précédente nous avons mis en évidence la possibilité de moduler la taille et la forme des domaines en phase gel d'une composition binaire, par simple variation de la température de fusion. Ici, nous nous sommes intéressés à l'influence du pourcentage de lipides saturés/insaturés qu'il pouvait avoir sur la morphologie des domaines observés par AFM.

Nous nous sommes donc proposés de préparer des liposomes à différents pourcentages en DPPC/DOPC et de visualiser la topographie par AFM. Pour cela, des liposomes à différents pourcentages de DPPC/DOPC (1:7, 1:3, 3:5, 1:1, 5:3, 3:1, 7:1, (ratio molaire), correspondant à 12,5 %, 25 %, 37,5 %, 50 %, 62,5 %, 75 %, 87,5 % de DPPC respectivement), sont déposés sur des surfaces de mica fraîchement clivées et enfin sont fusionnés à 21°C. Les images AFM obtenues pour chaque ratio sont présentées dans la Figure 49.

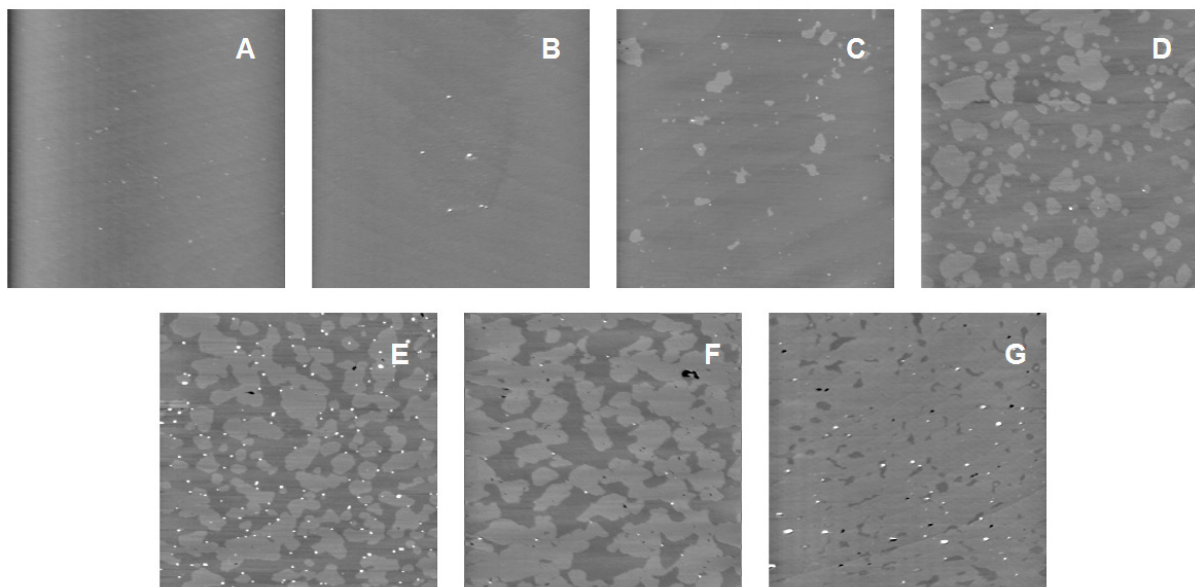


Figure 49. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC préparées à différents ratios molaires

Les échantillons sont fusionnés à 21°C et stockés à cette même température pendant une nuit avant d'être imagés par AFM. Les différents pourcentages de DPPC testés sont de 12,5 % (A), 25 % (B), 37,5 % (C), 50 % (D), 62,5 % (E), 75 % (F) et de 87,5 % (G). Toutes les images mesurent 20µm×20µm avec une échelle en z de 10 nm.

Nous pouvons remarquer sur les images A et B (à 12,5 et 25 % de DPPC respectivement), qu'il n'y a pas de ségrégation de phase ; aucun domaine en phase gel n'est visible au sein de

la bicouche. Nous pouvons supposer que les molécules de DPPC seraient dispersées au sein de la phase fluide. A partir de 37,5 % de DPPC incorporés dans les liposomes, des petits domaines de DPPC apparaissent, puisque la fusion est réalisée à 21°C. Les domaines, d'abord bien isolés en C et D (à 37,5 % et 50 % de DPPC), coalescent à partir de 62,5 % de DPPC, ne formant plus de domaines distincts à proprement dit. A 87,5 % de DPPC (Figure 49, G), la phase gel recouvre la quasi-totalité de l'image, ne laissant que des petits îlots de DOPC.

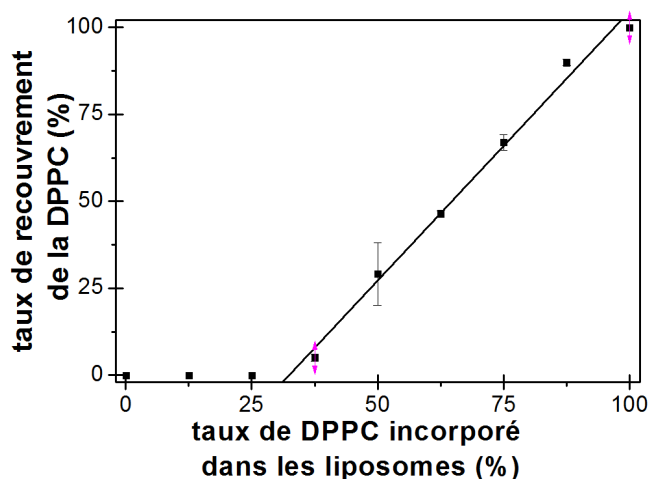


Figure 50. Influence du taux de DPPC sur le recouvrement.

Chaque point expérimental correspond à la somme des aires des domaines de DPPC, divisée par la surface totale de l'image (400 μm^2). Les mesures ont été effectuées sur 3 zones du même échantillon. Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, cette expérimentation a été réalisée en triplicata. Les points expérimentaux sont lissés avec une droite affine issue du logiciel OriginPro 8.5 dont l'équation est la suivante : $y = -50,2 + 1,5x$

En traçant le taux de recouvrement des domaines en phase gel en fonction du taux de DPPC incorporé dans les liposomes, nous pouvons constater deux phases (Figure 50). La première est une absence de ségrégation de phase et donc un recouvrement nul, puisque les molécules de DPPC sont dispersées dans la phase fluide. Dans un deuxième temps, nous pouvons observer une augmentation linéaire du taux de recouvrement de la phase gel en fonction du taux de DPPC incorporé dans les liposomes. Les points expérimentaux de cette deuxième phase ont été lissés par une droite affine pour en déterminer l'ordonnée à l'origine. Ainsi, en dessous de 32,5 % de DPPC incorporé dans les liposomes, les molécules de DPPC sont dispersées avec les molécules de DOPC pour former une bicouche homogène sans phase gel.

A partir des images AFM récoltées en Figure 49, nous pouvons aussi quantifier l'étendue des lignes de tension interfaciales existant entre les domaines gels et la phase fluide (Blanchette et al, 2007; Blanchette et al, 2008a). En effet, cette ligne constitue une zone particulière où une

partie des chaînes aliphatiques des lipides en phase gel est exposée au milieu aqueux. Cette ligne de défaut interagira donc préférentiellement avec des molécules hydrophobes. Elle constitue donc une zone intéressante à exploiter dans les études d'interaction avec des agents exogènes.

Nous avons donc quantifié cette ligne de tension interfaciale, en divisant le périmètre de la totalité des domaines présents sur une image, par la surface totale de l'image. Ainsi, la ligne de tension est exprimée par unité de surface ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$). Sur la Figure 51, nous pouvons voir que la ligne de tension interfaciale à différents pourcentages de DPPC suit une forme de cloche. En effet, nous pouvons observer une augmentation progressive de cette ligne de défaut jusqu'à un taux de 62,5 % de DPPC suivie d'une diminution brusque, pour être nulle à 100 % de DPPC (aucune ségrégation de phase possible puisqu'il ne s'agit pas d'un mélange binaire). Ainsi, la ligne de contact est maximale à 62,5 % avec près de 570 μm de longueur sur une image de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ représentant ainsi un ratio de près de $1,5 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ (Figure 51).

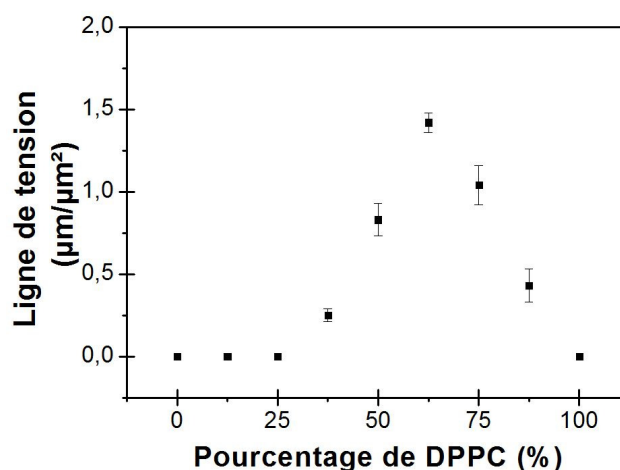


Figure 51. Influence du taux de DPPC sur la ligne de tension phase gel/fluide

Chaque point expérimental correspond à la longueur de la ligne de tension interfaciale entre phase gel et phase fluide divisée par l'aire totale de l'image ($400 \mu\text{m}^2$). Les mesures ont été effectuées sur 3 zones du même échantillon.

Cette ligne constitue donc une zone assez défavorable puisque une partie des chaînes hydrophobes du DPPC est exposée au milieu aqueux. A fortiori, les bicouches de DOPC/DPPC 3:5 (ratio molaire), présentant un maximum de ligne de tension, seraient les moins stables. De plus, les membranes utilisées dans cette partie ont été fusionnées à 21°C , c'est-à-dire que la diffusion des molécules de DPPC a été drastiquement diminuée limitant

l'organisation en gros domaines. A une température de fusion supérieure à la T_m de la DPPC, la ligne de tension interfaciale aurait été amoindrie, générant ainsi des SLBs thermodynamiquement plus stables.

I.3. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons pu voir l'influence de certains paramètres aussi bien chimiques (nature du lipide utilisé, pourcentage du lipide) que physiques (température) sur la morphologie de bicouches lipidiques mixtes. En effet, la modulation assez simple de ces paramètres nous a permis de générer des bicouches très diversifiées en termes de taille, et de morphologie.

Dans une première partie, nous avons pu mettre en évidence le rôle de la température de fusion dans le processus de diffusion des SLBs en relation avec la température de transition de phase des lipides utilisés. En effet, si la température de fusion est supérieure à la T_m , les phospholipides étant très mobiles (car en phase fluide) sont mélangés de manière homogène au sein de la bicouche supportées. Avec une baisse de la température après arrêt de la fusion, les lipides de DPPC ou de DSPC, vont pouvoir diffuser latéralement afin de s'organiser de manière à minimiser les lignes de tension défavorables, entre phase fluide et phase gel. Ainsi, ils vont former de gros domaines multilobés de l'ordre de 20 μm de diamètre. Au contraire, si la température est abaissée brutalement, les lipides répartis de manière homogènes vont se figer, l'énergie nécessaire à leur diffusion étant immédiatement restreinte. La mobilité des phospholipides étant réduite, ils vont former localement de petits domaines, les lignes de tension créées par la ségrégation de phase entre phase gel et phase fluide seront par conséquent plus importantes. Dans le cas où la température de fusion est inférieure à la T_m d'un des deux lipides (le DOPC, avec une T_m de -21°C , sera toujours à l'état fluide), ceux-ci ne seront pas répartis uniformément au sein de la bicouche supportée. De la même manière que lors du changement brutal de température, les lipides de DPPC ou de DSPC, ayant une mobilité réduite (car en phase gel), ne peuvent diffuser que très localement et s'organisent donc en petit domaines de l'ordre de 1 μm de diamètre.

Ainsi, la morphologie des bicouches mixtes, observées à l'AFM, est régie par les lois physiques de diffusion. Nous pourrions envisager à partir des paramètres étudiés (température

de fusion, T_m des lipides utilisés, vitesse de refroidissement), de prédire la taille ainsi que la morphologie bicouches lipidiques générées. D'autres facteurs seront à prendre en compte : comme la nature du support utilisé pour la fusion des SLBs ou encore d'autres paramètres influençant la T_m des lipides (Seeger et al, 2010). Le tampon utilisé pour la formation des SLBs est aussi un élément clé à considérer. En effet, le pH du et la concentration en sels (force ionique) du tampon affectent également la T_m (Seeger et al, 2009). Ces paramètres influencent directement la charge des phospholipides membranaires qui interagiront différemment avec le support, modulant par conséquent la morphologie de la SLB.

Dans une deuxième partie, nous avons modulé le pourcentage de phospholipides saturés (DPPC) / insaturés (DOPC), ce qui nous a permis d'établir une relation entre le ratio molaire de DOPC / DPPC utilisé pour la formation de SUVs et le taux de recouvrement, au sein de la SLB formée, de chaque phase (gel / fluide) visualisée à l'AFM. Ces expérimentations ont mis en évidence l'existence d'un pourcentage seuil en DPPC pour pouvoir obtenir une nucléation des domaines. En effet, en dessous d'un pourcentage extrapolé à 32,5 %, les molécules de DPPC ne peuvent former de domaines distincts en phase gel et sont dispersées dans la phase fluide enrichies en DOPC. Cependant, à partir de 32,5 % en DPPC, le taux de recouvrement entre phase gel et fluide suit une loi proportionnelle au ratio établit entre DPPC/DOPC dans la formation de SUVs, l'équation étant de la forme : $y = - 50,2 + 1,5x$. Ces expérimentations réalisées à une température de fusion de 21°C, montrent des morphologies (en termes de taille et contour) caractéristiques de celles observées précédemment, dans les mêmes conditions. La diffusion des lipides étant restreinte, les domaines de DPPC apparaissent petits (avec une taille variant de 0,5 à 2,5 μm de diamètre), s'interconnectant à partir d'un certain pourcentage (~ 62,5 %). Certaines expérimentations ont été conduites à une température de fusion de 60°C. Les résultats ont montré un comportement similaire en dessous de 32,5 % de DPPC incorporé dans les liposomes (dispersion des molécules de DPPC dans la phase fluide). Comme attendu, à des ratios plus élevés en DPPC, les domaines formés, plus gros, sont très dispersés, la relation proportionnelle semblant être respectée. Cependant, à des ratios en DPPC plus élevés, la formation de patch (double bicouche) au sein de la SLBs rend impossible l'évaluation de taux de recouvrement, à l'inverse des SLBs formées à température ambiante.

L'importance de ces modulations n'est pas seulement de mieux comprendre le fonctionnement et le comportement de ses membranes supportées mais surtout dans un but de les utiliser avec des agents exogènes. En effet, devant la diversité des molécules exogènes pouvant interagir avec les bicouches lipidiques, il serait pertinent de pouvoir moduler les morphologies des bicouches selon le mécanisme d'interaction entre l'agent exogène considéré et les SLBs³¹.

Enfin, tous ces paramètres physico-chimiques évoqués dans ce chapitre (qu'ils aient été mesurés directement ou bien calculés) nous ont permis d'éditer des protocoles de préparation de SLBs avec des propriétés contrôlées, pour des besoins spécifiques de caractérisation en AFM.

³¹ Ce point sera davantage détaillé et discuté dans la partie Discussion-Chapitre I

Chapitre II. Implication des membranes lipidiques dans la cristallisation de l'hématine

Comme évoqué dans la partie bibliographique (V.1.1. Cycle de développement du parasite), l'Hb, au niveau de la VD, est dégradée par le parasite, libérant ainsi l'hématine. Cette molécule toxique pourrait ainsi conduire à la lyse des cellules. Pour pallier ce problème, le parasite dispose d'un système de détoxification qui convertit l'hématine en un cristal inerte noir, l'Hz.

Beaucoup de travaux se sont intéressés au rôle des lipides dans ce processus de détoxification et notamment l'implication de l'interface lipide/eau dans la formation du cristal a été très étudiée (Ginsburg & Demel, 1983; Hoang et al, 2010b). Cependant, le mécanisme exact de cette transformation est encore mal défini puisque nombres d'hypothèses se recourent ou se contredisent laissant le doute sur le rôle véritable des lipides membranaires.

Ainsi, dans un premier temps, nous nous sommes proposés d'étudier les propriétés membranotropes des différentes formes d'hématines, selon le pH dans lequel elle se trouve, d'examiner les modalités de polymérisation de l'hématine en β -hématine. Enfin, l'AFM nous a permis de visualiser directement l'interaction entre des bicouches lipidiques et les différentes formes d'hématines.

II.1. Propriétés membranotropes de l'hématine

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au comportement de l'hématine à différents pH. En effet, comme évoqué dans la partie bibliographique V.1.3. Intervention de l'hématine et de ses dérivés dans le processus de détoxification, l'hématine en solution existe sous plusieurs formes (Asher et al, 2009) : monomérique ou dimériques selon la concentration, le pH et la force ionique. La forme monomérique est majoritaire à pH neutre et à faible concentration alors que la baisse du pH (à pH 5,2, pH de la vacuole digestive) favorise la dimérisation (dimère μ -oxo et π - π) de la molécule. La formation de ces dimères,

aussi bien μ -oxo, π - π que les dimères stables (H-T) suit un processus d'équilibre en fonctions des conditions environnementales.

Les propriétés membranotropes de l'hématine ont tout d'abord été caractérisées par les monocouches de Langmuir. Ainsi, les isothermes de compressions des molécules pures de l'hématine et d'un lipide, le POPC ont été enregistrés à différents pH : 7,4 (neutre) et 5,2 (acide) (voir Matériels et Méthodes, II.1. Tensiométrie de surface).

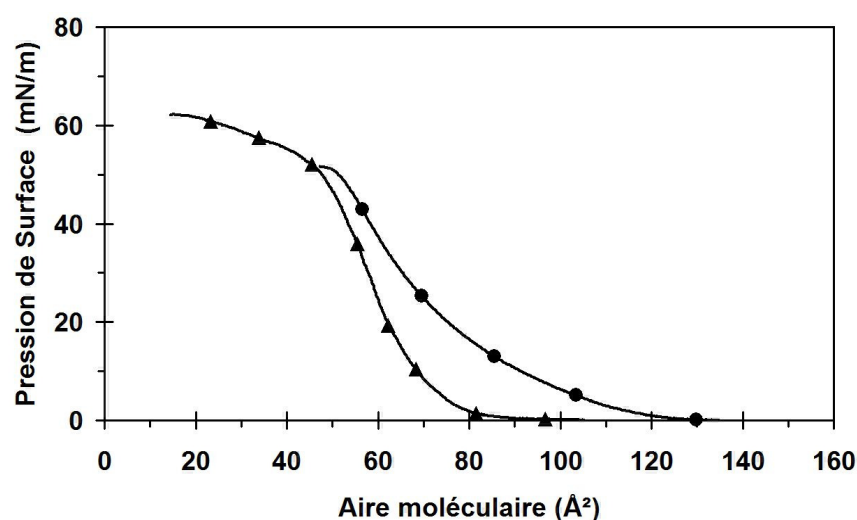


Figure 52. Isothermes de compression de l'hématine et de la POPC

Les isothermes de compression de l'hématine (triangle) et de la POPC (cercles) ont été réalisés à température ambiante (21°C) avec une sous-phase composée de tampon tris 100 mM, NaCl 150 mM, à pH 7,4. D'autres isothermes de compression des deux molécules pures ont également été effectuées avec une sous-phase à pH 5,2 ; les courbes, se superposant, n'ont pas été présentées.

Sur la Figure 52, on peut noter que le POPC possède une aire moléculaire de 90 Å²/molécule, par extrapolation de l'isotherme de compression. Cette valeur est tout à fait concordante aux données relevées dans la littérature (Kauffman et al, 2000). En ce qui concerne l'hématine, l'isotherme de compression montre que cette molécule peut former une monocouche à l'interface air/eau stable jusqu'au moins 50 mN/m. L'aire moléculaire de l'hématine à une pression proche de 30 mN/m (pression interne des membranes) est d'environ 70 Å²/molécule, valeur conforme aux données bibliographiques (Jin et al, 1999). De plus, quel que soit le pH de la sous phase, la courbe de l'isotherme (π -A) de l'hématine est identique (courbe superposée non montrée pour plus de lisibilité). Les fonctions carboxyliques de l'hématine ayant des pKa de 4,9 (Dorn et al, 1995), la charge de l'hématine aux deux pH testés est similaire. Ceci suggère donc que l'hématine adopterait la même orientation pour les deux pH

expérimentaux, avec probablement un positionnement des acides propioniques, chargés négativement, plongés dans la phase aqueuse, orientant la partie hydrophobe à l'interface air/eau (Figure 38).

Par la suite, la capacité d'insertion de cette molécule dans les monocouches de POPC a été mesurée en réalisant des remontées sur un puits en Téflon[®] d'une surface de 20 cm² et d'un volume de 64 mL (voir Matériels et Méthodes, II.1. Tensiométrie de surface). Sachant que l'hématine est capable de former une monocouche stable jusqu'à 50 mN/m, celle-ci a été injectée à différentes pressions initiales de 3 à 40 mN/m à une concentration finale de 1 μM. L'influence du pH a également été étudiée (Figure 53). L'injection de l'hématine dans la sous-phase à pH 7,4 provoque une augmentation quasi-immédiate de la pression de surface de l'ordre de 10 mN/m à des pressions initiales fortes, à près de 30 mN/m pour de faibles pressions initiales (Figure 53 A) indiquant une insertion des molécules d'hématine dans la monocouche de POPC. A l'inverse, l'injection de l'hématine dans la sous-phase à pH 5,2 n'est pas suivie d'une augmentation brutale de la pression de surface (Figure 53 B). Cette observation signifierait que l'hématine ne s'insère pas dans la monocouche de POPC à pH acide. Afin d'estimer le rôle de la modulation du pH, l'hématine est tout d'abord injectée dans la sous-phase à pH acide puis celui-ci est ajusté à 7,4. Ainsi, après ajout du NaOH, augmentant le pH de la sous phase, la pression de surface augmente significativement après un temps de latence de près de 15 minutes.

Afin de mieux visualiser l'insertion de l'hématine dans les monocouches de POPC dans les différentes conditions et de déterminer la pression d'insertion maximale (PIM) aux différents pH, une courbe secondaire représentant la variation de la pression de surface ($\Delta\pi$) en fonction de la pression de surface initiale est tracée (Figure 54).

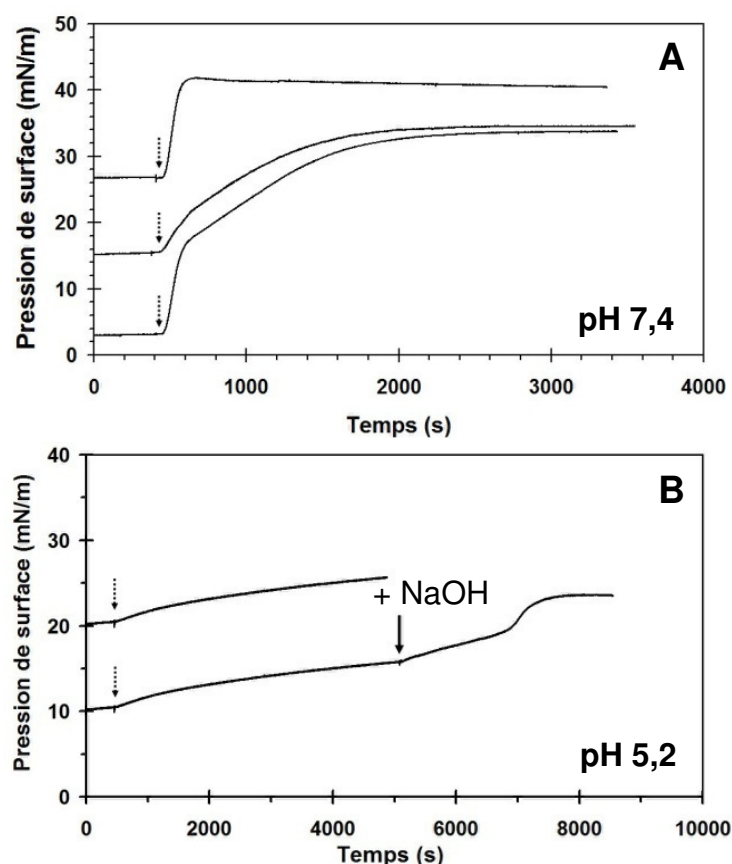


Figure 53. Cinétiques de remontée de l'hématine sous des monocouches de POPC à différentes pressions initiales

L'hématine est injectée à une concentration finale de $1\mu\text{M}$ dans la sous-phase à différents pH : 7,4 (A) et 5,2 (B). Le tampon de la sous-phase est composé de 150 mM NaCl, 100 mM Tris et 100 mM acétate de sodium. Les flèches en pointillés indiquent le moment de l'injection de l'hématine et la flèche pleine signale l'ajout d'une solution de NaOH pour augmenter le pH de 5,2 à 7,4. Les expérimentations sont réalisées à 21°C .

Sur ce graphique, l'influence du pH sur l'insertion de l'hématine dans les monocouches de POPC est très nette. En effet, à pH neutre, nous avons pu déterminer, par extrapolation de droite, une PIM de 47 mN/m ce qui est proche de la valeur déterminée par Ginsburg avec une monocouche de DOPC (Ginsburg & Demel, 1983). Ces résultats montrent que l'hématine est donc capable de s'insérer dans les membranes biologiques dont la pression latérale est proche de 30 mN/m (Marsh, 1996). Lorsque l'hématine est injectée dans la sous-phase à pH acide puis ajustée à 7,4, nous pouvons observer que les $\Delta\pi$ mesurés sont proches de ceux calculés à pH neutre, la PIM correspondante est de 41 mN/m. Cette valeur est donc légèrement inférieure à celle obtenue à pH neutre suggérant ainsi que la réversibilité n'est que partielle.

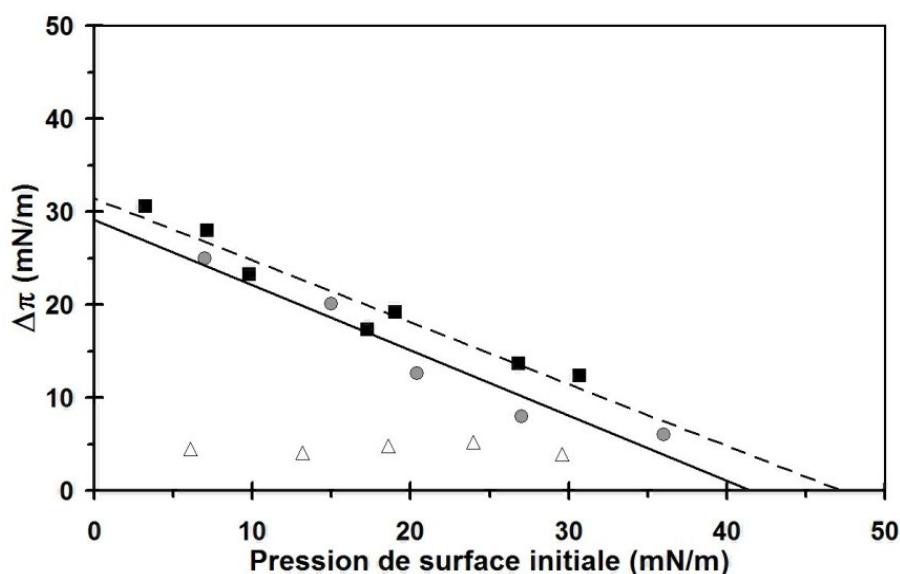


Figure 54. Insertion de l'hématine dans les monocouches de POPC

Les $\Delta\pi$ sont calculés à partir des cinétiques de remontées de l'hématine à différentes pressions initiales de la monocouche lipidique. L'insertion de l'hématine est mesurée à différents pH de la sous-phase : à 5,2 (triangles blancs), à 7,4 (carrés noirs) et 5,2 puis ajusté à 7,4 (ronds gris). Le tampon de la sous-phase est composé de 150 mM NaCl, 100 mM Tris et 100 mM acétate de sodium. Les expérimentations sont réalisées à 21°C.

A l'inverse, à pH acide, quelle que soit la pression de surface initiale, le $\Delta\pi$ mesuré est constant (~ 4 mN/m) ce qui signifierait que l'hématine est incapable de s'insérer dans les monocouches de POPC à pH 5,2.

Afin d'expliquer la réversibilité partielle du phénomène nous pouvons supposer que l'hématine n'est pas capable de retrouver totalement sa propriété membranotrope dès lors qu'elle est soumise à un pH acide, soit à cause de l'apparition d'une nouvelle forme d'hématine aux propriétés interfaciales différentes, soit parce que la variation de pH provoquerait une agrégation d'une partie de l'hématine. D'après la littérature, une diminution de l'absorbance à 385 nm (caractéristique des noyaux porphyrines) serait due à la dimérisation et non pas nécessairement à la formation d'agrégats d'hématine (Omodeo-Salè et al, 2001). De plus, d'après nos résultats, cette forme d'hématine serait à priori présente en majorité à pH acide, vu le profil de la courbe d'insertion de l'hématine à ce pH. L'état d'équilibre entre monomères et dimères (μ -oxo et π - π) serait donc directement influencé par le pH et ceci de manière partiellement réversible (Villiers et al, 2007).

II.2. Modalités de polymérisation de l'hématine en β -hématine

II.2.1. Cinétique de polymérisation de l'hématine

L'Hz, produit naturellement par le parasite dans la VD peut être comparée à la β -hématine. En effet, ce polymère synthétique est chimiquement et structuralement identique (Pagola et al, 2000) et peut être facilement obtenu *in vitro* dans certaines conditions. Egan et ses collaborateurs ont ainsi développé un protocole simple pour synthétiser la β -hématine à partir d'hématine (Parapini et al, 2000). Cette méthode est détaillée dans la partie Matériels et Méthodes, III.2. Dosage de l'hématine. Brièvement, la solution d'hématine est incubée dans un milieu acide (acétate de sodium à pH 4,5) à 60°C. Nous nous sommes donc proposés d'utiliser ce protocole pour étudier la cinétique de polymérisation de l'hématine.

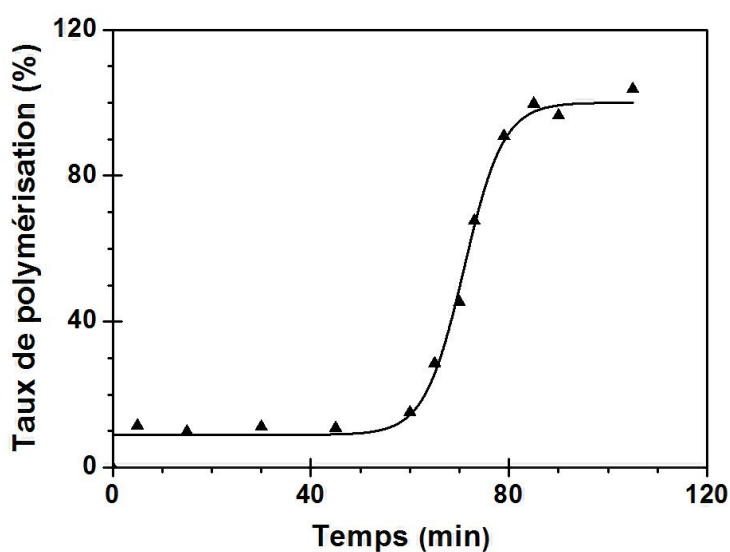


Figure 55. Cinétique de polymérisation de l'hématine en β -hématine

La solution d'hématine, est incubée à 60°C pendant différents temps puis l'hématine libre est dosée par ajout de la pyridine à 5 % (volume) au tampon de polymérisation (pH 4,5). Les points expérimentaux sont lissés avec une courbe de dose-réponse issue du logiciel OriginPro 8.5 dont l'équation est la suivante : $y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(log_{x_0} - x)p}}$ où A_1 et A_2 sont les asymptotes minimum et maximum respectivement, log_{x_0} indique l'abscisse au point d'inflexion et p représente la pente de Hill.

Ainsi l'hématine est incubée à différents temps dans le tampon de polymérisation avant d'être dosée par la pyridine. Dans la Figure 55, nous pouvons observer une cinétique de polymérisation avec une allure sigmoïdale ponctuée de 3 phases. Nous pouvons tout d'abord distinguer une phase de latence d'environ 60 minutes durant laquelle l'hématine est sous

forme libre. Puis, le taux de polymérisation augmente brusquement pendant 20 minutes avant d'atteindre un plateau correspondant à une polymérisation totale de l'hématine. Le point d'inflexion de la courbe, correspondant à 50 % de la polymérisation de l'hématine totale, est déterminé à 73 minutes. Cette cinétique de polymérisation est comparable à celle obtenue par l'équipe d'Egan (Egan et al, 2001) dans les mêmes conditions (voir Matériels et Méthodes, III.2. Dosage de l'hématine).

II.2.2. Mesures des propriétés interfaciales de l'hématine en cours de polymérisation

Afin d'examiner le pouvoir membranotrope des différentes espèces obtenues à différents taux de polymérisation, nous avons étudié la capacité d'insertion de la solution d'hématine ainsi obtenue, dans une monocouche de POPC à une pression de surface initiale de 20 mN/m.

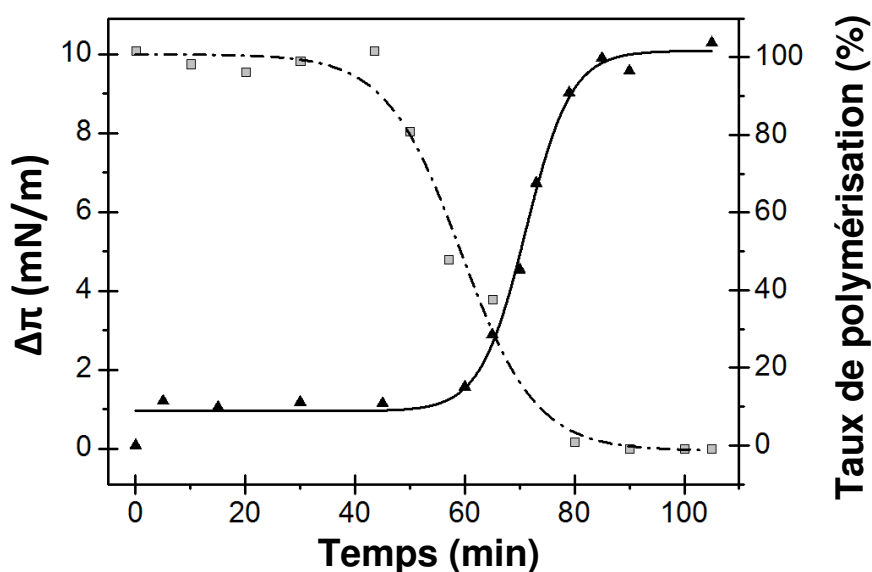


Figure 56. Influence de la polymérisation de l'hématine sur son insertion dans les monocouches de POPC
 La solution d'hématine est injectée dans la sous-phase, à une concentration finale de 1 μM, à différents temps de polymérisation. Les $\Delta\pi$ sont calculés à partir des cinétiques d'insertion de l'hématine au sein d'une monocouche de POPC à une pression initiale de 20 mN/m (carrés gris). Le point d'inflexion de la courbe, représentant l'évolution des $\Delta\pi$, est évalué à 59 min. La cinétique de polymérisation est également présentée (triangles noirs) pour plus de lisibilité. Le point d'inflexion de la cinétique de polymérisation est déterminé à 71 min. La sous-phase est constituée de tampon TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris) avec 100 mM d'acétate de sodium. Les expérimentations sont réalisées à 21°C. Les points expérimentaux sont lissés avec une courbe de dose-réponse issue du logiciel OriginPro 8.5 dont l'équation est la suivante : $y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(logx_0 - x)p}}$ où A_1 et A_2 sont les asymptotes minimum et maximum respectivement, $logx_0$ indique l'abscisse au point d'inflexion et p représente la pente de Hill.

Sur la Figure 56, nous pouvons observer que les points expérimentaux, représentant les $\Delta\pi$ en fonction du temps de polymérisation, suivent également une allure sigmoïdale. En effet, pendant les 50 premières minutes, la variation de pression mesurée reste constante à 10 mN/m puis diminue rapidement avant d'être nulle à partir de 80 minutes. Ces résultats suggèrent donc que la β -hématine formée est incapable de s'insérer dans les monocouches de POPC contrairement à la forme libre d'hématine.

De plus, nous pouvons noter que le point d'inflexion de la courbe est décalé avec celui de la cinétique de polymérisation (Figure 56). Ceci suggère qu'il pourrait exister une autre forme d'hématine, dosable par la pyridine, mais incapable de s'insérer dans les monocouches lipidiques de POPC. La concentration utilisée de pyridine étant relativement faible, il n'y a pas de doute possible que cette molécule se soit intercalée entre les dimères d'hématine, ainsi seule la forme monomérique de l'hématine est dosée. De plus, d'après la littérature, la formation du cristal se fait en plusieurs étapes : l'hématine est d'abord dimérisée puis ceux-ci sont assemblés par des liaisons hydrogènes pour former enfin le polymère (Pagola et al, 2000). Ainsi, la forme monomérique de l'hématine serait majoritaire pendant les 50 premières minutes, d'où l'insertion observée. Puis, la dimérisation de la molécule, conduisant à une baisse de la proportion de la forme monomérique, provoquerait une diminution de la variation de pression. Enfin, moins de 20 minutes plus tard, les formes dimériques de l'hématine seraient assemblées en β -hématine, le taux de polymérisation augmentant très fortement indiquerait la disparition quasi-totale de l'hématine libre.

II.2.3. Influence des lipides sur la cinétique de polymérisation

Afin d'infirmar ou de confirmer les hypothèses suggérant l'implication des lipides dans la détoxification de l'hématine (Egan et al, 2006; Hempelmann et al, 2003; Hoang et al, 2010b), nous nous sommes proposés d'étudier l'influence de la présence de membranes lipidiques (sous forme de liposomes) sur la cinétique de polymérisation de l'hématine en β -hématine. Pour cela, l'hématine est ajoutée au tampon de polymérisation en absence ou en présence de 0,5 ou 1 mM de liposomes de DOPC/DPPE 1:1 (ratio molaire).

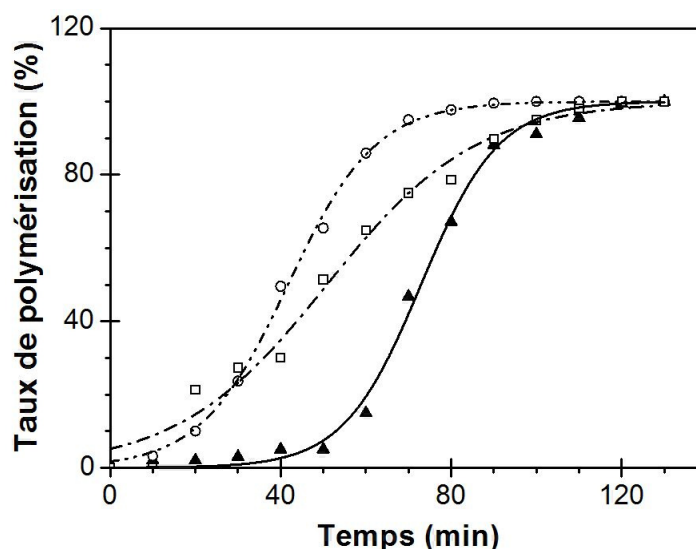


Figure 57. Influence de la présence de lipides sur la cinétique de polymérisation

La solution d'hématine, à une concentration de 1,76 mM, est incubée à 60°C pendant différents temps en absence (triangles noirs) ou en présence de 0,5 mM (carrés blancs) ou 1 mM (cercles blancs) de liposomes de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). L'hématine libre est ensuite dosée par ajout de la pyridine à 5 % (volume) au tampon de polymérisation. Les points expérimentaux sont lissés avec une courbe de dose-réponse issue du logiciel OriginPro 8.5 dont l'équation est la suivante : $y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{-(\log x_0 - x)p}}$ où A_1 et A_2 sont les asymptotes minimum et maximum respectivement, \log_{x_0} indique l'abscisse au point d'inflexion et p représente la pente de Hill.

De la même manière que précédemment, l'hématine libre est dosée par la pyridine à différents temps d'incubation. Nous pouvons remarquer sur la Figure 57 que la phase de latence généralement observée sans lipide est réduite de près de 40 minutes en présence de liposomes. En effet, la polymérisation de l'hématine à pH acide, et à 60°C, commence réellement après 50 minutes d'incubation, comme décrit précédemment (Figure 55) alors qu'en présence de liposomes à 0,5 ou 1 mM, celle-ci débute au bout de 15 minutes. De plus, le point d'inflexion, représentant le temps nécessaire pour obtenir 50 % de la polymérisation de l'hématine, est réduit à 51 et 42 minutes en présence de liposomes à 0,5 et 1 mM respectivement. Ainsi, la présence de lipides accélérerait la cinétique de polymérisation de l'hématine par deux.

Afin d'étudier l'influence de la nature des lipides composant les liposomes sur le processus de détoxification de l'hématine, les mêmes cinétiques de polymérisation ont été menées en présence de liposomes de DPPC purs, de DOPC purs et d'un mélange de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

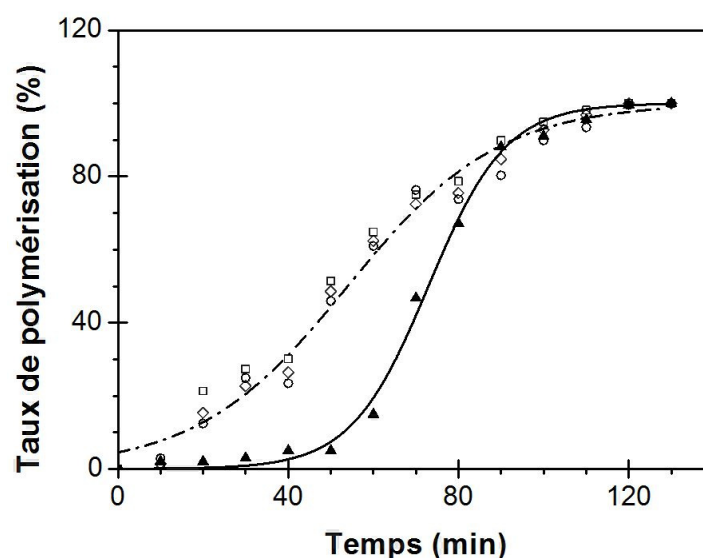


Figure 58. Influence de la nature des lipides sur la cinétique de polymérisation

La solution d'hématine, à une concentration de 1,76 mM, est incubée à 60°C pendant différents temps en absence (triangles noirs) ou en présence de liposomes, à 0,5 mM, constitués de DPPC purs (carrés blancs), de DOPC purs (cercles blancs) ou d'un mélange de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire ; losange blancs). L'hématine libre est ensuite dosée par ajout de la pyridine à 5 % (volume) au tampon de polymérisation. Les points expérimentaux sont lissés avec une courbe de dose-réponse issue du logiciel OriginPro 8.5 dont l'équation est la suivante : $y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(log_{x_0} - x)p}}$ où A_1 et A_2 sont les asymptotes minimum et maximum respectivement, log_{x_0} indique l'abscisse au point d'inflexion et p représente la pente de Hill.

Les résultats obtenus sont présentés en Figure 58. Outre le rôle de catalyseur des liposomes sur la cinétique de polymérisation de l'hématine, nous n'avons pas observé de différences significatives de la cinétique de polymérisation réalisée avec des liposomes de compositions différentes. Ainsi, les cinétiques de polymérisation, réalisées dans les mêmes conditions, seraient identiques quelle que soit la nature des lipides utilisés dans notre étude.

Bien que les conditions de polymérisation dans le protocole choisi ne soient pas du tout physiologiques (température élevée, pH très acide), l'implication des lipides dans le processus de polymérisation de l'hématine est indéniable. En effet, comme l'ont montré les travaux d'Egan (Hoang et al, 2010b), la température choisie dans ce protocole accélère certes, le processus de polymérisation qui prendrait une dizaine d'heures à température physiologique, mais n'altère en rien le rôle catalyseur des lipides.

L'hypothèse soutenue par Egan selon laquelle, la nucléation du cristal serait favorisée par l'interface lipide/eau, pourrait expliquer l'accélération de la cinétique de polymérisation que nous avons observé (Egan, 2008b). Ainsi, pour confirmer l'implication des lipides dans la

polymérisation, nous nous sommes proposés de visualiser directement cette interaction entre hématine et lipides grâce à l'AFM.

II.3. Interaction de l'hématine et de ses dérivés avec des modèles membranaires supportés

Les expérimentations précédentes ont montré que le pH pouvait moduler le pouvoir membranotrope de l'hématine. Ainsi, la modulation de l'équilibre entre les formes monomériques et dimériques de l'hématine par le pH, pourrait être la clé de la stratégie développée par le parasite dans le processus de détoxification de l'hématine. Nous nous sommes donc proposés de visualiser l'interaction entre l'hématine et des membranes lipidiques à différents pH, générant ainsi les différentes formes d'hématine.

II.3.1. Conditions favorisant les formes monomériques (pH neutre)

Dans cette sous partie, l'hémine est solubilisée dans du NaOH à 0,1 M avant d'être diluée à différentes concentrations dans du tampon Tris 100 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4. Les solutions sont ensuite injectées sur une bicouche lipidique plane de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) présentant donc une ségrégation de phase : les domaines en phase gel enrichis en DPPC sont entourés d'une phase fluide enrichie en DOPC.

II.3.1.1. Injection de l'hématine à faible concentration

Après injection d'une solution d'hématine à 8 μM , nous pouvons observer sur la Figure 59, une modification des contours du domaine qui deviennent immédiatement plus anguleux. De plus, nous pouvons noter un épaississement des bords immédiat dès la première image acquise après 5 minutes d'incubation et qui demeure stable pendant au moins 120 minutes. Enfin, en mesurant les différences de hauteurs sur des sections d'images, nous pouvons mesurer une diminution de hauteur entre phases gel et fluide, avant et après injection de la solution d'hématine. En effet, les domaines de DPPC sont normalement surélevés de $(1,1 \pm 0,1)$ nm par rapport à la DOPC avant injection de l'hématine. Cependant d'après les mesures effectuées, la différence de hauteur entre les deux phases est réduite à $(0,6 \pm 0,1)$ nm en présence d'hématine.

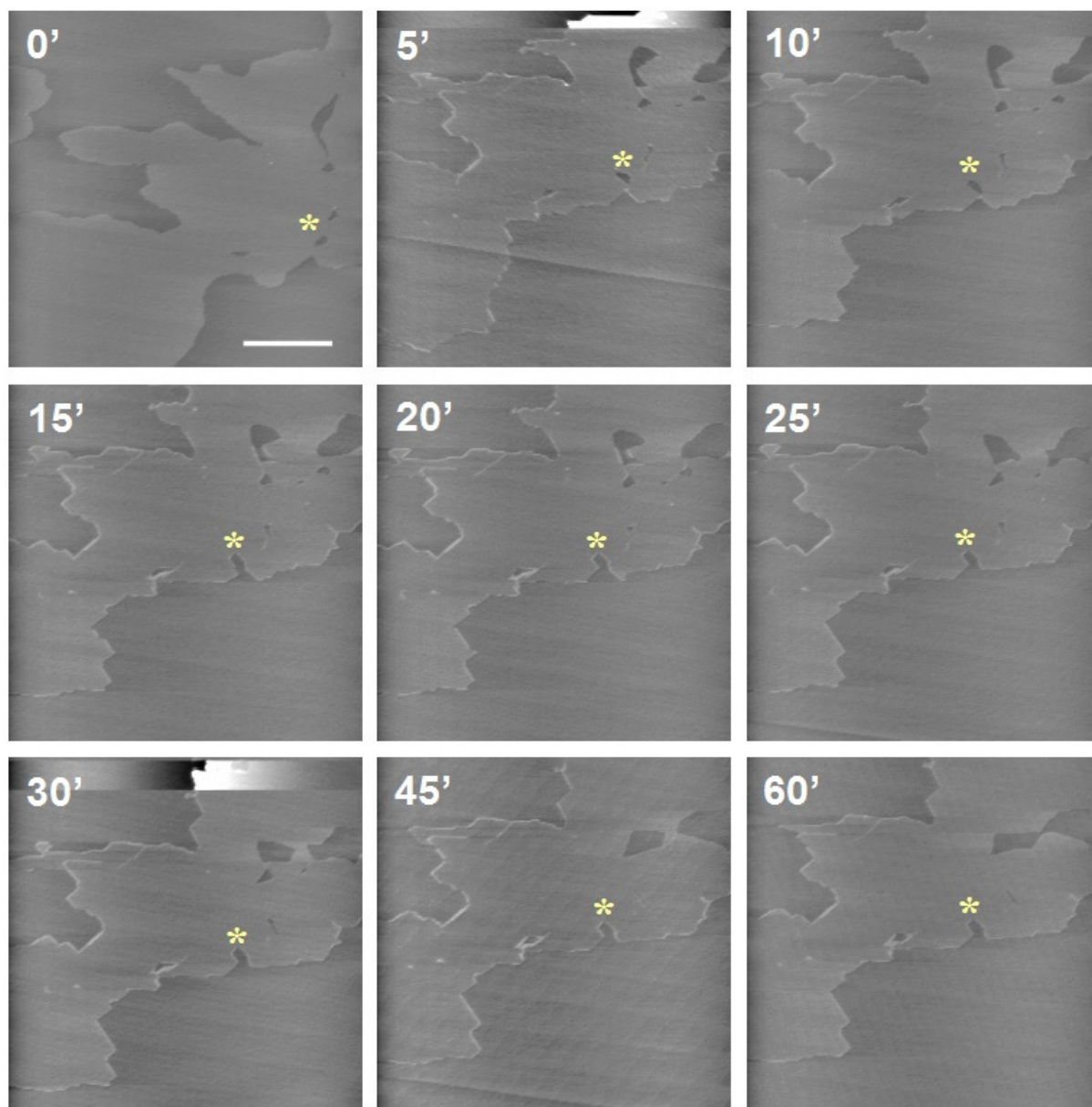


Figure 59. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à 8 μM avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

L'hématine à 3,5 mM dans le NaOH est diluée à 8 μM dans le tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La solution est ensuite injectée sur une SLB de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Des images de la même zone (astérisque) sont enregistrées à différents temps d'incubation jusqu'à 60 minutes. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 μm , échelle en z = 10 nm.

Afin de mieux visualiser l'épaississement observé sur le bord des domaines de DPPC, nous avons réalisé des grossissements de cette zone, permis par la haute résolution de l'AFM.

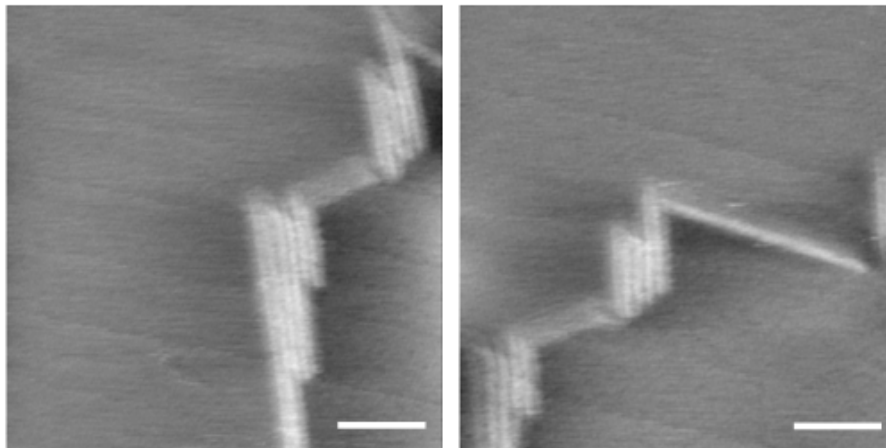


Figure 60. Grossissement de l'épaississement observé au niveau des bords des domaines

L'épaississement observé en Figure 59, après injection d'une solution d'hématine à $8\mu\text{M}$ à pH neutre, montre qu'il s'agit de structures périodiques d'environ 54 ± 4 nm. Barre d'échelle = 500 nm, échelle en z = 3 nm.

Sur les grossissements présentés en Figure 60, nous pouvons observer que cet épaississement est structuré avec une périodicité de l'ordre de 54 ± 4 nm. La présence de ces structures explique donc les contours anguleux observés dans les images de la Figure 59. De plus, nous pouvons aussi supposer, d'après ces résultats, que les structures périodiques présentes uniquement sur les bords du domaine pourraient être des molécules d'hématine organisées en faisceaux. L'affaissement du domaine de DPPC observé par la réduction de la différence de hauteur entre les phases gel et fluide, pourrait également être expliqué par l'insertion d'hématine dans la bicouche provoquant une modification de l'ordre des molécules de DPPC, causant probablement une interdigitation des queues hydrophobes.

II.3.1.2. Injection de l'hématine à concentration intermédiaire

Afin d'examiner l'effet de la concentration sur l'interaction entre l'hématine et les bicouches lipidiques, nous avons décidé d'augmenter la concentration de l'hématine. Ainsi, nous avons choisi d'injecter une solution à $10\mu\text{M}$ d'hématine. La Figure 61, présente le suivi AFM, de 0 à 60 minutes, de l'évolution de la bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) après l'addition d'une telle concentration. Nous pouvons observer un épaississement très large des bords du domaine de DPPC très rapidement (dès 5 minutes), prolongé perpendiculairement par la formation de structures aussi bien dans la phase fluide que dans la phase gel. De plus, nous pouvons remarquer la prolifération de ces structures qui croissent, en longueur ainsi qu'en largeur, durant tout le suivi. Au bout de 45 minutes, le phénomène semble ralentir

puisque la quasi-totalité du domaine initial de DPPC et une grande partie de la phase fluide environnante est déjà recouverte par ces structures.

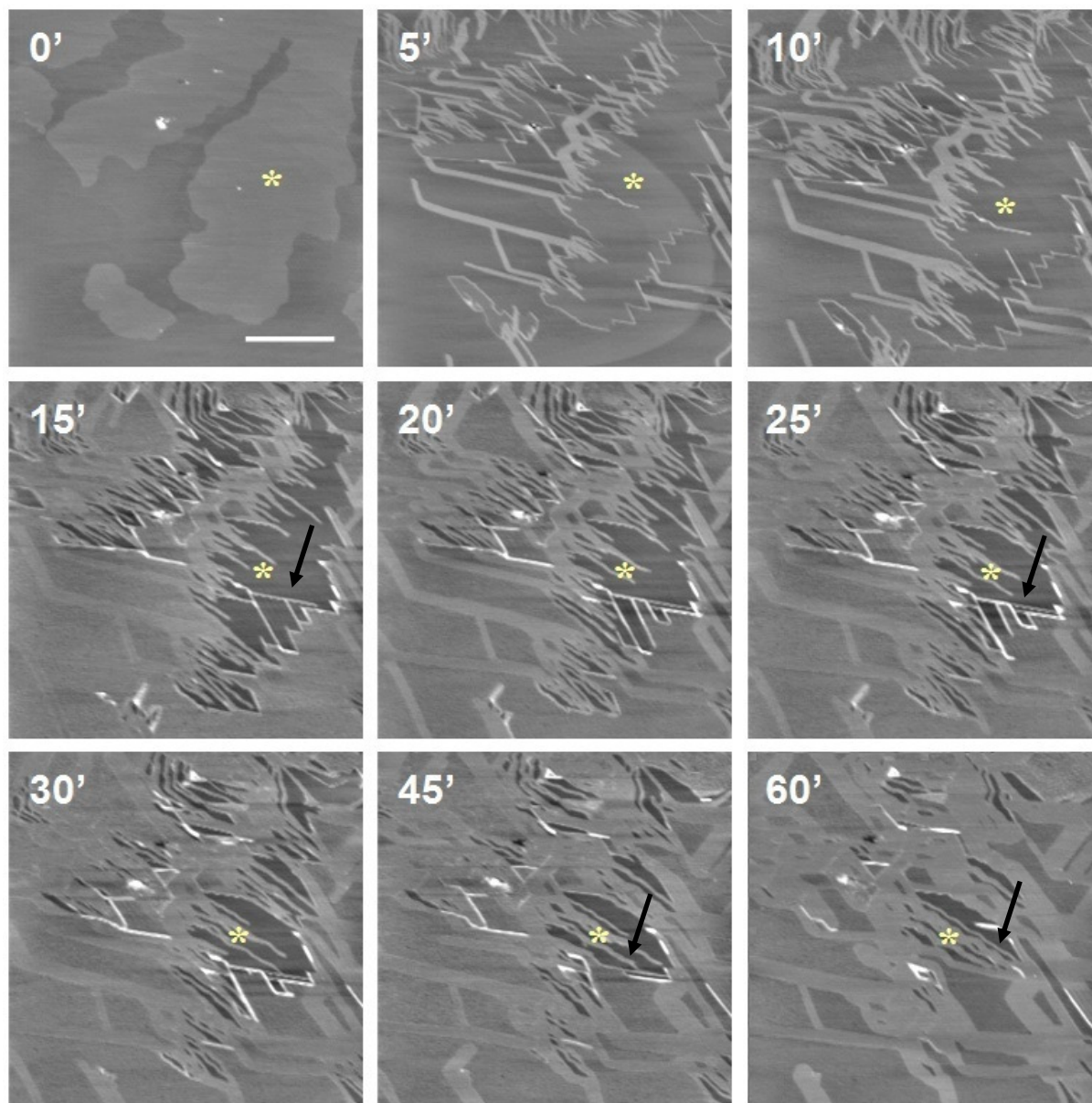


Figure 61. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à 10 μ M avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

L'hématine à 3,5 mM dans le NaOH est diluée à 10 μ M dans le tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La solution est ensuite injectée sur une SLB de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Des images de la même zone (astérisque) sont enregistrées à différents temps d'incubation jusqu'à 60 minutes. Les flèches noires indiquent l'apparition de structures plus fines et plus épaisses qui disparaissent avec le temps. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 μ m, échelle en z = 10 nm.

Nous avons suivi la croissance de quelques structures se développant au sein de la DPPC. Tout d'abord, nous pouvons remarquer que celles-ci progressent en longueur pendant les 30

premières minutes d'incubation avant de recouvrir la totalité du domaine en phase gel. Au delà, nous observons plutôt un phénomène d'accroissement en largeur. Nous pouvons aussi noter que la croissance est très rapide avec une vitesse moyenne de croissance de l'ordre de $0,15 \mu\text{m}/\text{minute}$.

De plus, en observant précisément le phénomène, nous pouvons détecter l'apparition de structures plus claires (donc plus hautes de l'ordre de 4 nm par rapport à la DOPC) qui apparaissent au bout de 15 minutes (Figure 61, flèche noire) et disparaissent progressivement à partir de 25 minutes. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : soit ces structures ont été résorbées par la membrane, et ont participé à l'étendue des structures dans la membrane, soit elles se sont détachées de celle-ci, pour rejoindre le milieu d'incubation.

Aussi, en examinant l'évolution du domaine de DPPC au fur et à mesure du suivi, nous avons pu noter un affaissement progressif de celui-ci. En effet, la différence de hauteur mesurée par rapport à la DOPC varie donc de $1,1 \pm 0,1 \text{ nm}$ (0 minute) à $- 1,4 \pm 0,2 \text{ nm}$ (60 minutes). Cette dépression est beaucoup plus importante que celle observée après injection d'une solution moins concentrée d'hématine (Figure 59) ce qui corroborerait l'hypothèse de l'insertion plus massive de l'hématine à plus forte concentration. De plus, l'affaissement considérable du domaine de DPPC (environ de $2,4 \text{ nm}$ au total) est concordant à d'autres dépressions membranaires rapportées dans la littérature (Mou et al, 1994a), établissant une interdigitation des chaînes aliphatiques des molécules de DPPC.

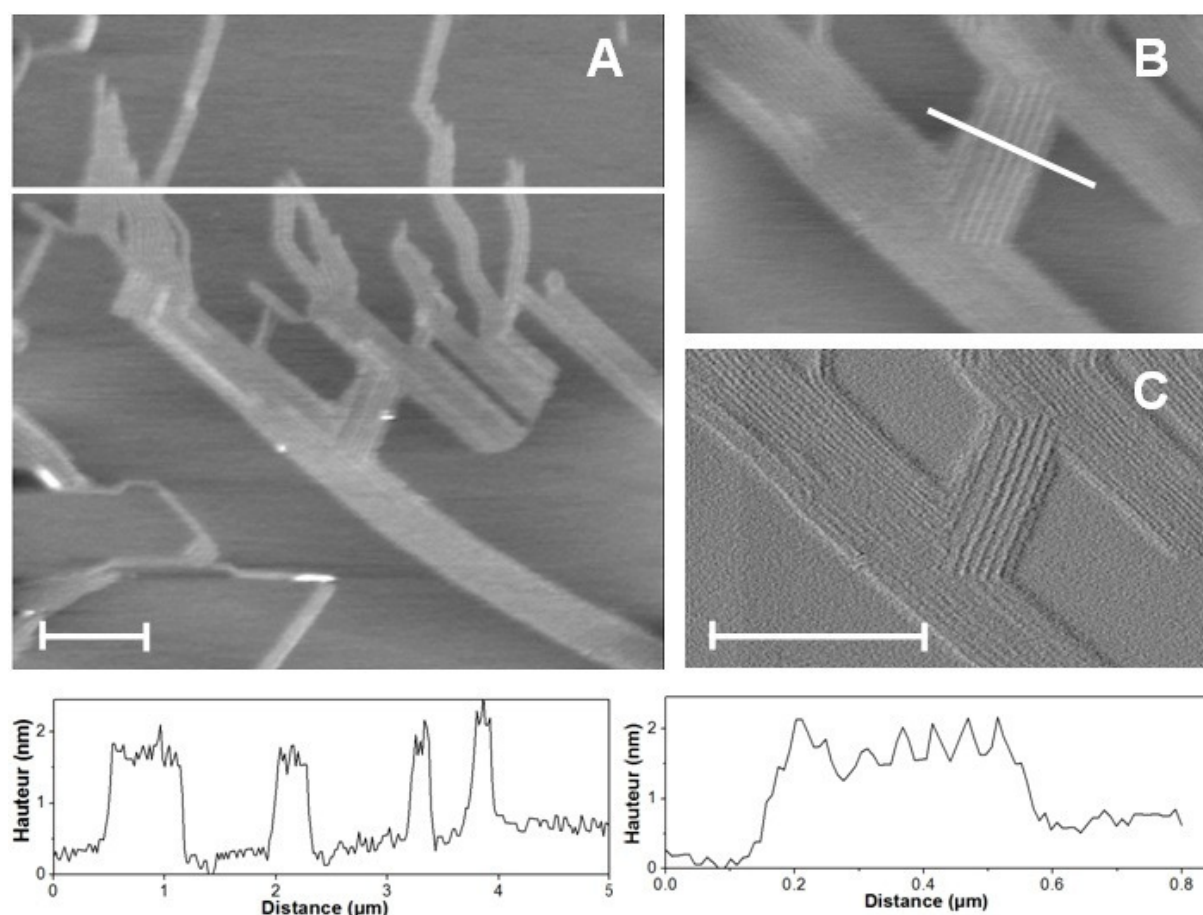


Figure 62. Grossissement des structures observées après injection de l'hématine à 10 μM

Les structures observées en Figure 61, après injection d'une solution d'hématine à 10 μM à pH neutre, sont caractérisées par leur épaisseur (A) de $(1,5 \pm 0,2)$ nm (par rapport à la DOPC) et par leur périodicité (B et C) d'environ $(51,4 \pm 11,0)$ nm. Les traits de section réalisés (traits blancs) sont représentés sous chaque image correspondante. Les images de hauteur présentent une échelle en z de 7,5 nm (A et B) et l'image de déflexion, une échelle en z de 0,01 V (C). Barre d'échelle = 1 μm .

En grossissant les structures observées dans le suivi AFM (Figure 62), nous nous sommes aperçus que les structures étaient également organisées en faisceaux avec une périodicité propre. En réalisant des traits de section nous avons pu déterminer l'épaisseur de $(1,5 \pm 0,2)$ nm par rapport à la DOPC (Figure 62 A) ainsi une périodicité de $(51,4 \pm 11,0)$ nm (Figure 62 B).

Si nous comparons les effets observés après injection d'une solution d'hématine à 8 μM et 10 μM , nous pouvons remarquer que le phénomène est similaire (épaississement des bords, structures périodiques, affaissement de la DPPC) mais beaucoup plus spectaculaire et étendu à plus forte concentration. Les structures observées seraient donc attribuées à l'hématine qui s'organiserait d'une telle façon au contact d'une membrane lipidique. Une autre hypothèse

RESULTATS

moins probable serait que l'injection de l'hématine dans ces conditions provoquerait une modification de l'état de phase de la membrane. En effet, ces structures périodiques anguleuses ressemblent fortement à l'arrangement d'une membrane en phase ripples (comme évoqué dans la partie bibliographique, I.3. Etats physiques des membranes). Cependant, plusieurs arguments infirment cette supposition, qui ne peut être prise en considération : les différentes phases ripples ont été largement caractérisées notamment par Kaasgaard et Mou (Kaasgaard et al, 2003; Mou et al, 1994b) et les amplitudes et périodicités ne correspondent pas à celles que nous avons mesuré après injection de l'hématine. De plus, les phases ripples n'ont jamais été observées uniquement entourant un domaine de DPPC. Ainsi, pour s'assurer que l'effet observé ne soit pas dû à la concentration élevée en Tris (100 mM), nous avons réalisé une expérimentation témoin, en injectant une solution contenant les mêmes constituants que précédemment à l'exception de l'hématine, dans les mêmes conditions de température et de pH.

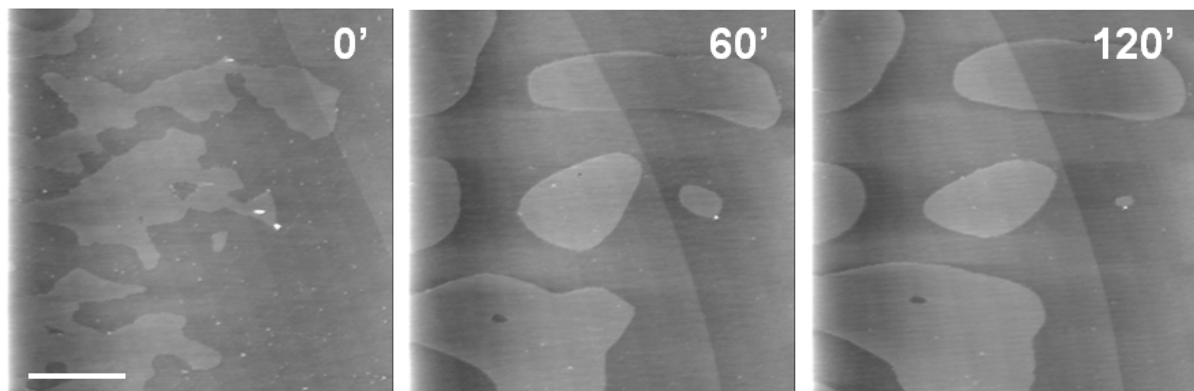


Figure 63. Suivi AFM après injection d'une solution de contrôle sur une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

La solution contrôle est réalisée de la même manière que lors des expérimentations précédentes à l'exception de l'intervention de l'hémine : 50 μ L de NaOH sont ajoutés au tampon Tris 100 mM, 150 mM NaCl (à pH 7,4), puis est déposée sur une SLB de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Des images de la même zone sont enregistrées à différents temps d'incubation jusqu'à 3 heures. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 μ m, échelle en z = 10 nm.

Sur la Figure 63, nous pouvons constater que, même après un long moment d'incubation avec la solution témoin, aucun épaissement des bords des domaines de DPPC et aucune structure apparentée à celles observées précédemment n'apparaît durant le suivi. Par contre, nous pouvons noter que le domaine de DPPC est fortement remodelé, les bords étant très arrondis, à l'opposé des contours anguleux observés ultérieurement. Nous en déduisons donc que seule l'injection de l'hématine provoque la formation de ces structures fibreuses périodiques.

II.3.1.3. Injection de l'hématine à forte concentration

Afin d'évaluer si l'activité membranotrope de l'hématine peut effectivement conduire à la solubilisation membranaire (Huy et al, 2004) dans nos conditions, nous avons décidé de doubler la concentration d'hématine injectée sur la SLB.

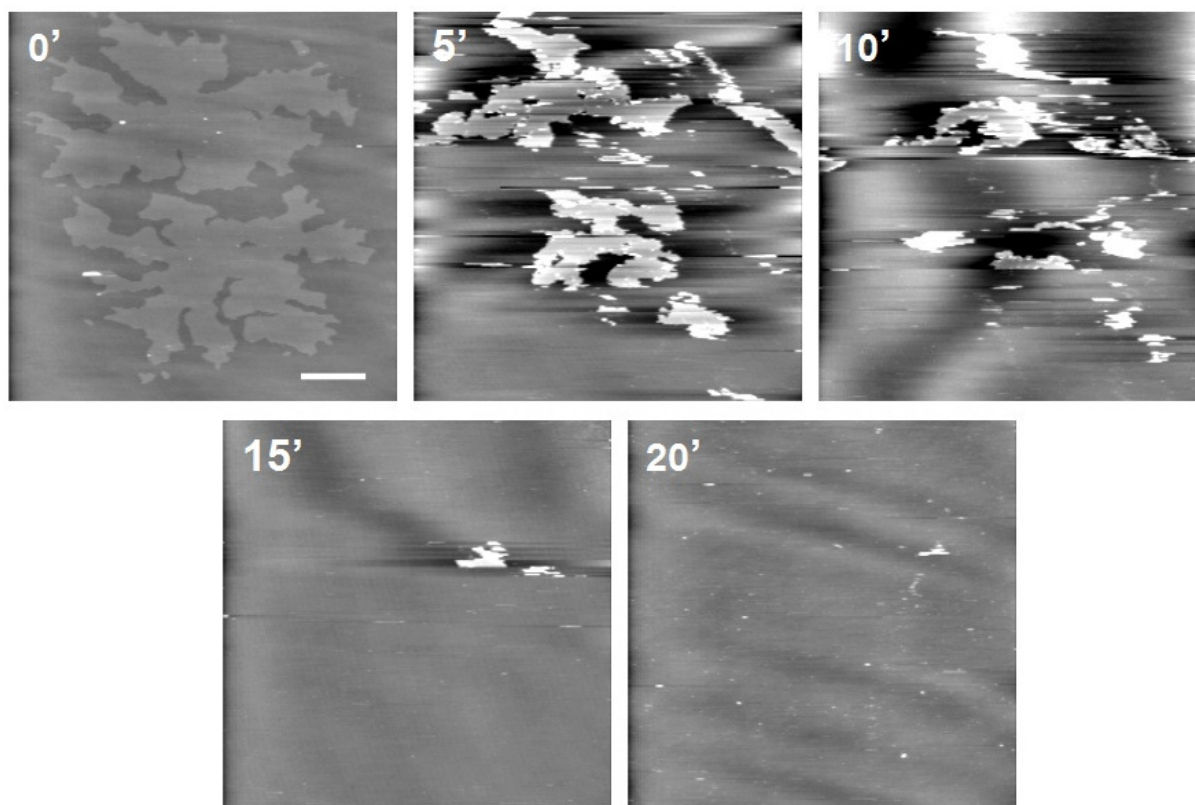


Figure 64. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à 20 μ M avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

L'hématine à 3,5 mM dans le NaOH est diluée à 20 μ M dans le tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La solution est ensuite injectée sur une SLB de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Des images de la même zone sont enregistrées à différents temps d'incubation jusqu'à 20 minutes. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 μ m, échelle en z = 10 nm.

Sur le suivi présenté dans la Figure 64, nous pouvons voir qu'à une forte concentration d'hématine, l'effet lytique de la molécule est avéré. En effet, nous pouvons observer dès les 5 premières minutes une désorption de la phase fluide de DOPC ne laissant qu'une partie des domaines de DPPC. Ceux-ci disparaissent progressivement jusqu'à 20 minutes, où la solubilisation est totale. De plus, nous pouvons remarquer l'absence de formation de structures probablement due à la déstabilisation décuplée de la membrane.

Ceci expliquerait l'importance vitale de la régulation de la concentration de l'hématine lors de la dégradation de l'Hb. En effet, une dégradation trop rapide libérerait une quantité d'hématine qui pourrait conduire directement à la lyse des membranes du parasite. Celui-ci procède donc plutôt à une lyse progressive de l'Hb libérant une concentration plus faible mais continue d'hématine, qui est incorporée au fur et à mesure dans un cristal inerte, empêchant ainsi sa propre destruction.

A travers ces premiers résultats nous pouvons conclure que l'hématine, injectée à pH neutre, provoque très rapidement la formation de structures organisées à partir de l'interface fluide/gel. La ligne de tension créée par la ségrégation de phase entre les domaines de DPPC et la phase fluide de DOPC instaure une zone de « défaut », où une partie des queues hydrophobes des lipides de DPPC localisée en bordure du domaine est exposée au milieu aqueux. Ainsi, cette zone constitue une région de choix pour interagir avec les noyaux hydrophobes des molécules d'hématine, ce qui expliquerait également la stabilité du phénomène observé lors des différents suivis.

Reste à mieux comprendre le rôle de la modulation de pH lors de la dégradation de l'hématine et de la formation de l'Hz dans la VD à pH acide. C'est pour cela que nous avons choisi d'évaluer le comportement d'une solution d'hématine à 10 μM (à une concentration intermédiaire) à différents pH.

II.3.2. Conditions favorisant les formes dimériques (pH acide)

D'après les résultats obtenus avec les monocouches de Langmuir, le pouvoir membranotrope de l'hématine est modulé par le pH. Ainsi, un pH acide favoriserait la dimérisation des molécules d'hématine qui seraient alors incapables de s'insérer dans les monocouches. Face à ce constat nous avons décidé d'injecter une solution d'hématine à 10 μM diluée dans du tampon Tris 100 mM à pH 5,2, mimant le pH de la vacuole digestive du parasite, lieu de la formation des cristaux de Hz.

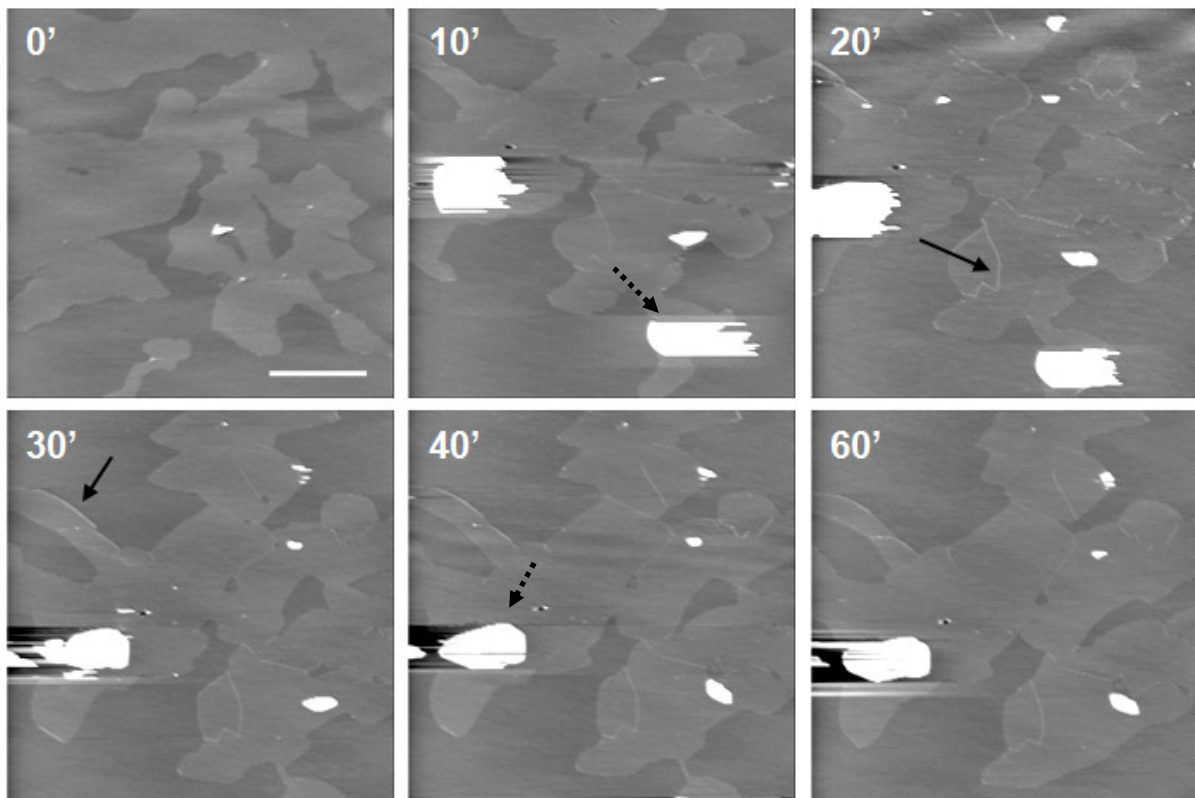


Figure 65. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine à pH 5,2 avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

L'hématine à 3,5 mM dans le NaOH est diluée à 10 μ M dans le tampon Tris 100 mM à pH 5,2. La solution est ensuite injectée sur une SLB de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Des images de la même zone sont enregistrées à différents temps d'incubation jusqu'à 60 minutes. Les flèches pleines indiquent un épaissement au niveau du domaine de DPPC et les flèches en pointillés montrent des agrégats d'hématine. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 μ m, échelle en z = 10 nm.

D'après la Figure 65, après injection de la solution d'hématine à pH acide, nous n'observons aucun épaissement des bords du domaine de DPPC ni d'apparition de structures similaires à celles décrites précédemment. Ce suivi confirme donc que l'hématine à pH acide perd son pouvoir membranotrope et interagit peu avec les membranes lipidiques. Ainsi, les formes dimériques, majoritaires à ce pH, ne peuvent pénétrer dans la membrane pour former des fibres, mais s'agrègeraient plutôt à sa surface (Figure 65, flèches en pointillés)

Nous pouvons alors nous interroger sur la stratégie de détoxification utilisée par le parasite. A pH acide, les molécules d'hématine sont certes, sous formes dimériques, et peuvent participer à la formation du cristal. Cependant, en quoi interviennent les lipides en tant que catalyseur puisque à ce pH, membranes et lipides n'interagissent plus ? Pourquoi la vacuole digestive du parasite est-elle maintenue à pH acide ? Afin d'élucider ces questions, nous avons décidé

d'étudier le comportement d'une solution « intermédiaire » où coexisteraient les formes monomériques et dimériques.

II.3.3. Conditions établissant un équilibre monomères/dimères (pH acide puis neutre)

Les vésicules cytosomales sont formées par invagination des membranes du parasite et de la VP pour récupérer les molécules d'Hb présentes dans le cytoplasme de l'hématie. Ainsi, le pH du cytoplasme érythrocytaire serait donc au pH physiologique donc, 7,4. Les modulations de pH au sein des vésicules sont encore sujet à débat (Bakar et al, 2010; Lazarus et al, 2008). Les vésicules cytosomales, déversant leur contenu dans la vacuole digestive, nous avons décidé d'évaluer le comportement d'une solution d'hématine ayant subi un changement de pH, perturbant ainsi l'équilibre monomère/dimères. D'après les résultats obtenus avec les monocouches de Langmuir, le pouvoir membranotrope de l'hématine peut être réversible en modulant le pH. Ainsi, comme nous l'avons vu, l'augmentation du pH acide puis neutre restitue à l'hématine son activité membranotrope partiellement. Ainsi, nous nous sommes proposés d'effectuer un traitement acide de la solution d'hématine avant de retrouver un pH neutre afin de rééquilibrer les formes dimériques et monomériques. Pour cela, nous avons tout d'abord incubé l'hématine concentrée (1,76mM) pendant quelques secondes dans le tampon de polymérisation (pH 4,5) avant de la diluer à une concentration finale de 10 μ M, dans le tampon Tris 100 mM à pH 7,4. Cette solution est directement ajoutée sur la membrane de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

La Figure 66, présente le suivi AFM, de 0 à 210 minutes, de l'évolution de la bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) après l'addition de la solution d'hématine traitée par l'acide. Nous pouvons observer un phénomène relativement lent par rapport aux expérimentations précédentes, avec un épaissement des bords, visible à partir de 30 minutes d'incubation. Au bout de 50 minutes commence à apparaître différents types de structures caractérisées par une épaisseur propre. Nous pouvons distinguer des structures longilignes très claires donc épaisses et des structures plus étendues et plus fines (Figure 66 flèches pleines et flèches en pointillés). L'apparition de ces structures s'intensifie au fur et à mesure que le temps d'incubation est prolongé ; celles déjà existantes croissent également dans les deux directions (elles deviennent ainsi plus longues et plus larges).

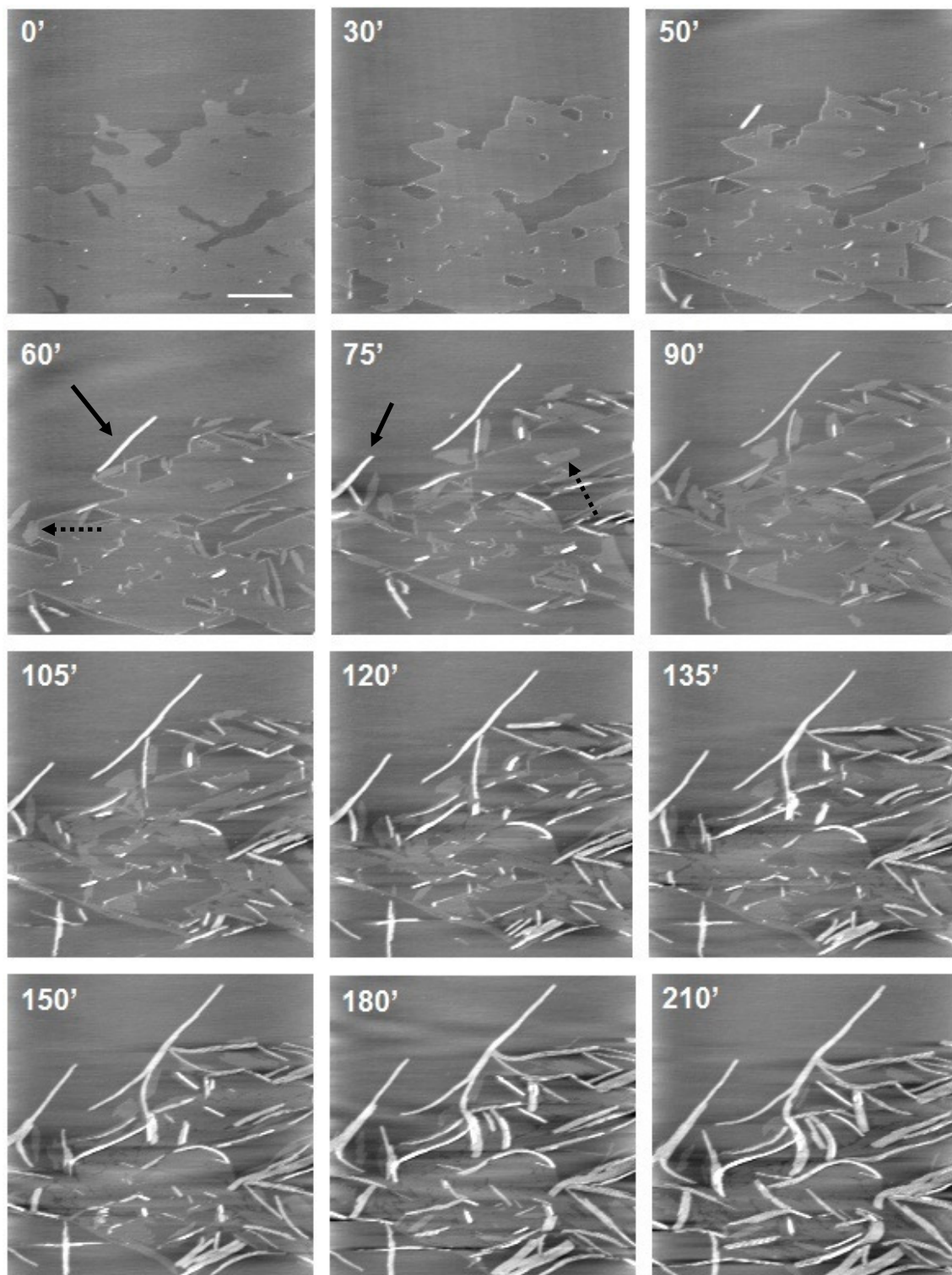


Figure 66. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine, incubée à pH 5,2 puis ramenée à pH neutre, avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

L'hématine concentrée est tout d'abord incubée dans le tampon de polymérisation acide puis est immédiatement diluée dans un grand volume de tampon Tris 100 mM, pH 7,4. La solution (à 10 μ M), est ensuite injectée sur une SLB de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Des images de la même zone sont enregistrées à différents temps d'incubation jusqu'à 225 minutes. Les flèches pleines indiquent les structures épaisses et celles en pointillés, les structures plus fines. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 μ m, échelle en z = 10 nm.

Le domaine initial de DPPC, nous le voyons très nettement, s'affaisse progressivement au moment où les structures émergent (vers 50 minutes) pour être totalement recouvert par ces multiples structures.

Nous pouvons noter dans ce suivi, que l'épaississement ainsi que l'apparition de ces structures prennent également départ au niveau de l'interface fluide/gel. De même, nous pouvons visualiser que le domaine initial de DPPC est également remodelé après ajout de la solution d'hématine, caractérisé par des pourtours anguleux.

Si nous nous intéressons au mécanisme global évoluant pendant ces 225 minutes, nous pouvons remarquer une phase de latence plutôt longue qui était absente ou extrêmement courte (inférieure à 5 minutes) lors de l'injection d'une solution d'hématine à pH neutre. Cependant, si nous nous rappelons des expérimentations en monocouches détaillées dans la Figure 53, après modulation du pH, une phase de latence de 15 minutes avait été observée avant que les molécules ne s'insèrent dans la monocouche de POPC. Bien que la durée de latence ne puisse pas être comparée entre ces deux expérimentations (concentrations en lipides et en hématines différentes), ce temps est néanmoins observé dans les deux cas. Ainsi, nous pouvons en déduire que cette modulation de pH, provoque un changement d'équilibre entre les phases dimériques et monomériques qui n'est pas spontané.

Concernant les différents types de structures observées, des grossissements ont été réalisés pour pouvoir mieux les caractériser. Ainsi, sur la Figure 67, nous pouvons voir sur la première image, deux types représentatifs de structures épaisses : celles arrangées en fagot (moins épaisses mais plus larges) avec une amplitude de l'ordre de $(2,5 \pm 0,7)$ nm et une périodicité de (94 ± 22) nm, et celles organisées en faisceaux (plus épaisses et moins larges) définies par une amplitude de $(5,0 \pm 0,3)$ nm. Sur des images à plus fort grossissement, nous avons pu visualiser que ces structures grises plus étendues recouvrant la quasi-totalité du domaine initial de DPPC étaient aussi organisées en fibres, beaucoup plus fines (en termes de hauteur) comparables à celles observées après injection d'une solution d'hématine à pH neutre. En effet, ces structures sont caractérisées par leur amplitude de l'ordre de $(1,2 \pm 0,2)$ nm et une périodicité de (136 ± 43) nm. Nous pouvons donc, à l'issue de ces suivis, supposer que les structures organisées, observées à l'AFM, sont des fibres d'hématine.

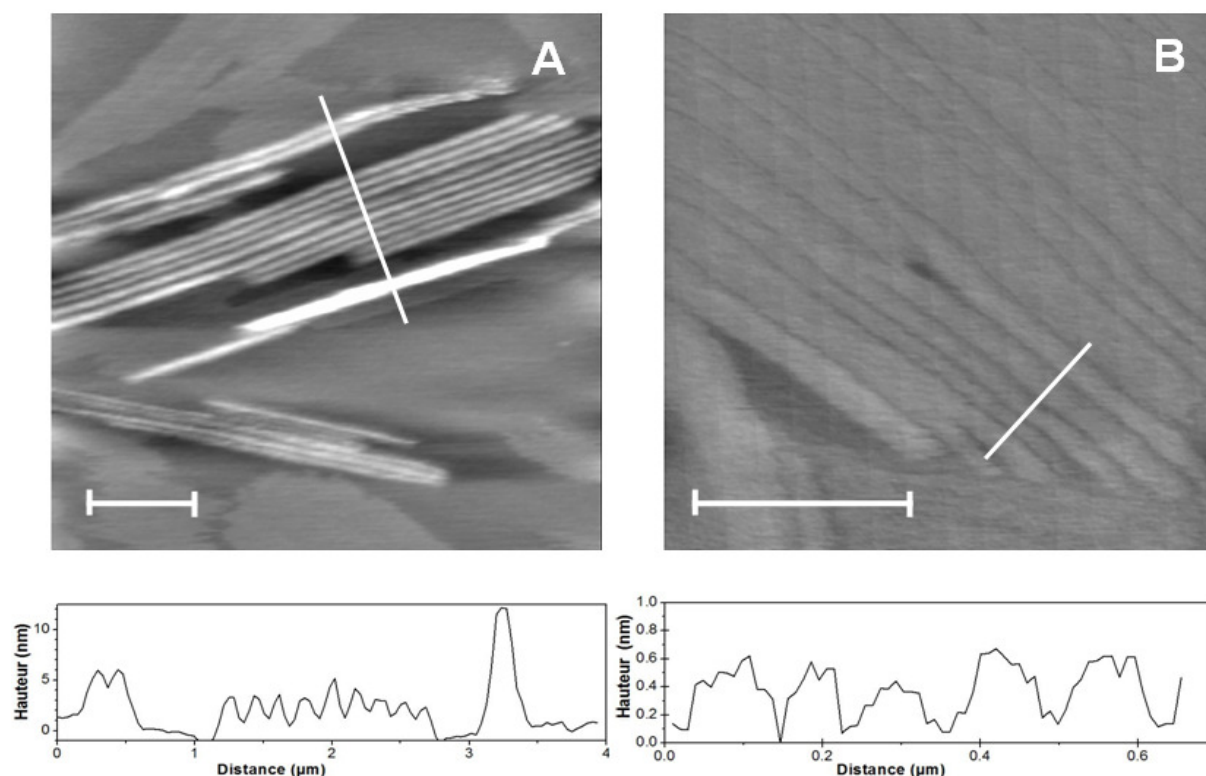


Figure 67. Grossissements des structures observées après injection de l'hématine à 10 μM

Les structures observées en Figure 66, après injection d'une solution d'hématine à 10 μM incubée à pH acide puis ramenée à pH neutre, sont caractérisées par leur amplitude et leur périodicité (voir les traits de sections réalisés). Différents types de structures sont observés : des fibres épaisses (A) ou fines (B). Les images de hauteur présentent une échelle en z de 10 nm (A) et de 5 nm (B). Barre d'échelle = 1 μm .

De plus, en observant bien le détail de l'apparition de ces structures distinctes sur la Figure 66, nous remarquons qu'il semblerait que les fibres épaisses apparaissent au niveau des fibres plus fines et étendues. Les structures épaisses se serviraient donc de cette « phase grise » étendue comme de support pour sa croissance.

Si nous nous attachons à la croissance des fibres épaisses, nous pouvons visualiser leur évolution dans la Figure 68. En effet, les images présentent trois grossissements de la même zone imagée à 145 minutes, 190 minutes et 215 minutes. Dans un premier temps, nous pouvons prouver la croissance en longueur de l'une d'entre elles tout du long de cette phase grise fibreuse (Figure 68, structure entourée de pointillés roses). Étonnamment, nous avons pu observer sur les mêmes images que ces structures peuvent changer d'orientation, pour former des « fagots » plus larges avec d'autres fibres (Figure 68, astérisque jaune).

Enfin, grâce à des traits de section réalisés sur une même fibre au même endroit (point de repère établi grâce aux pointillés roses), nous avons pu mesurer l'évolution dans le temps de

la hauteur de cette fibre par rapport à la membrane. Ainsi, nous avons pu déterminer une épaisseur de l'ordre de 3,0-3,6 nm à 145 minutes, de 4,0-4,6 nm à 190 minutes et de l'ordre de 5,3-6,5 nm à 215 minutes. Cette augmentation de taille suggère, soit que des molécules d'hématine sont ajoutées, participant au grossissement en x et en z de la fibre existante, soit que la fibre reste stable en termes de diamètre mais qu'elle se libère du support que constitue la membrane, pour rejoindre par la suite le milieu aqueux.

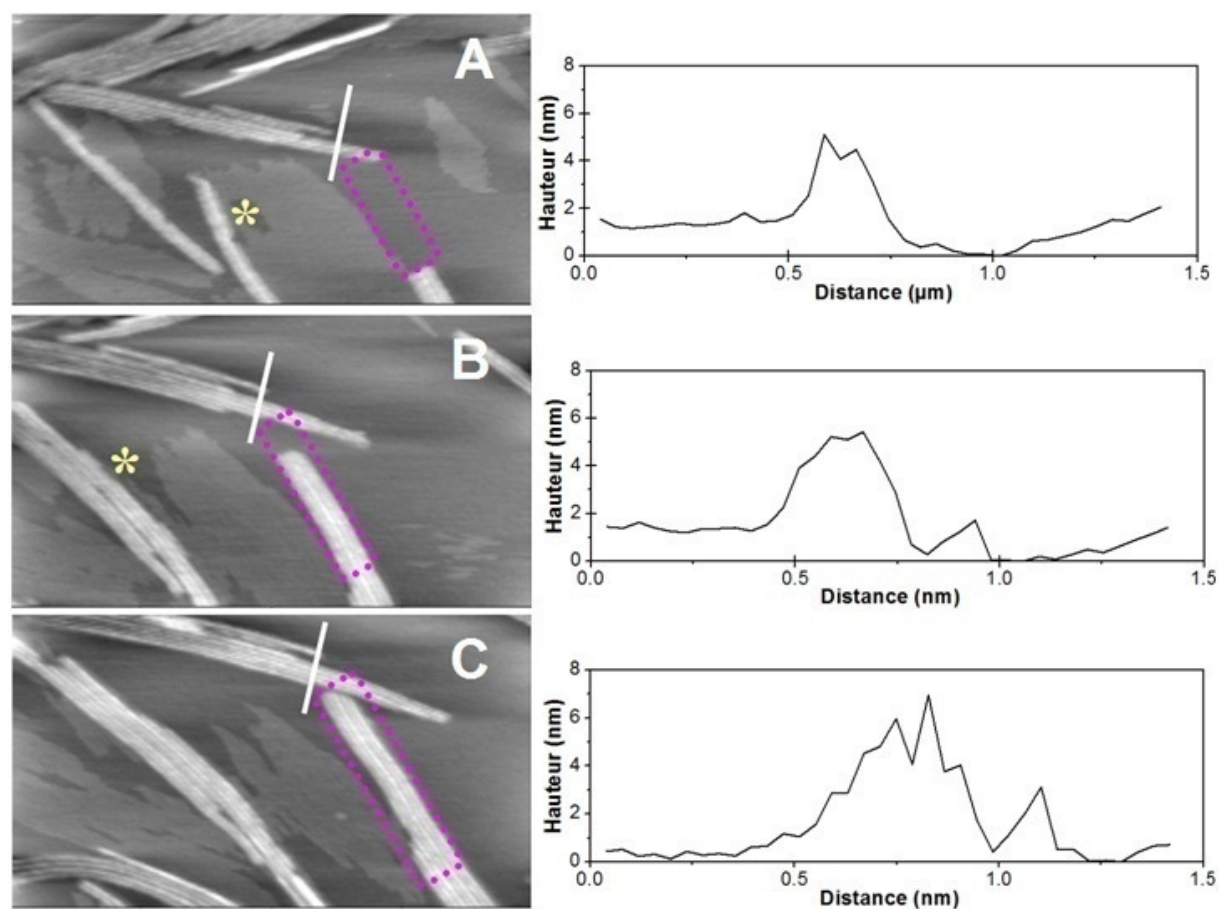


Figure 68. Evolution de la taille des structures fibreuses dans le temps

Des grossissements des structures épaisses ($10\mu\text{m} \times 5.6\mu\text{m}$; z-range = 10 nm) sont acquises tout au long du suivi à 145 min (A), 190 min (B) et 215 min (C). Les images de hauteur montrent la croissance au sein de la bicouche d'une structure (pointillés roses). Ces fibres, sous l'influence de la proximité avec une autre fibre peuvent changer d'orientation pour se regrouper (astérisque jaune). Enfin, des traits de sections sont réalisés sur chaque image pour mesurer l'évolution de la croissance en z de ces structures.

Enfin, si nous nous attachons plus précisément à la croissance de ces différentes fibres tout au long du suivi, nous pouvons estimer leurs vitesses d'élongation. La Figure 69 présente le suivi de croissance en longueur (x) de sept fibres sélectionnées aléatoirement. Sur le graphique, nous pouvons considérer 3 populations : une première correspondant à une seule et unique

fibre à la croissance très rapide, et deux populations qui ont le même profil de croissance (vitesse moyenne similaire) mais qui sont décalées dans le temps. En effet, la deuxième population apparaît dès les premières 60 minutes alors que la troisième ne commencent à croître qu'après 90 minutes. D'après ces résultats ces deux populations ont une vitesse de croissance moyenne de (41 ± 11) nm/min. L'exception est pour l'unique fibre épaisse se développant dans la phase fluide. Ainsi, nous pourrions supposer que la phase fluide ne favorise pas le développement de ces fibres épaisses mais lorsque celles-ci se retrouvent dans la phase fluide, la croissance est beaucoup plus rapide, de l'ordre de 100 nm/min. ceci pourrait être expliqué par une nucléation difficile au niveau de la phase fluide du à la forte mobilité des lipides mais à l'inverse celle-ci favoriserait la croissance de ces fibres.

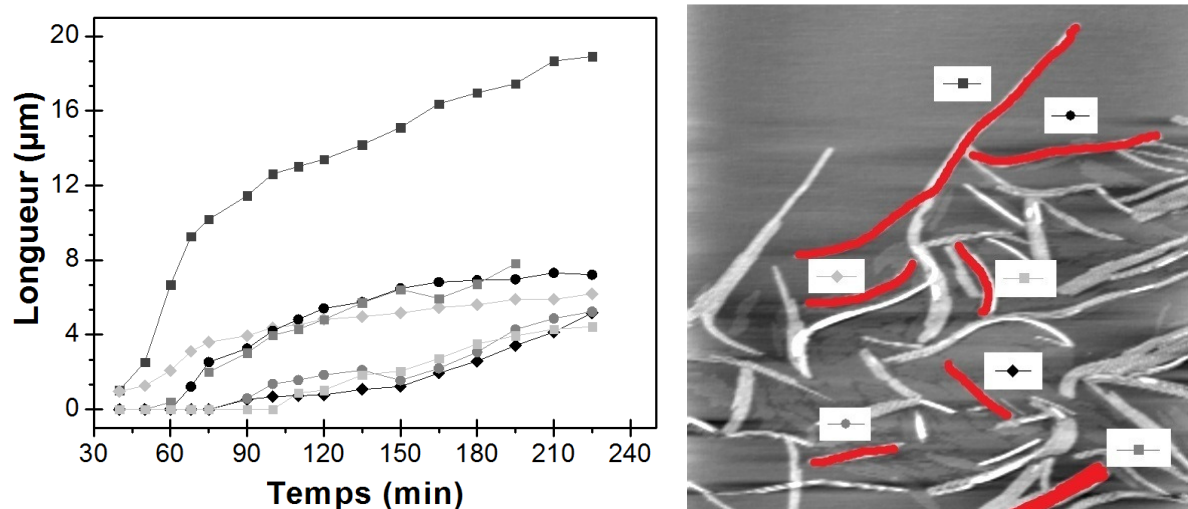


Figure 69. Evaluation de la croissance moyenne des structures fibreuses

Sept fibres, choisies de manière aléatoire ont été étudiées, de leur apparition (à partir de 40-90 minutes) jusqu'à la fin du suivi (225 minutes). L'évolution de leur longueur a été mesurée puis répertoriée dans le graphique ci-dessus. Chaque fibre est signalée par un trait rouge et un symbole correspondant.

Si nous comparons tous ces suivis, nous pouvons constater que les fibres fines et étendues correspondant à la « phase grise », caractérisées après modulation de pH, et celles observées à pH neutre présentent une amplitude similaire. Par contre, les périodicités sont entre 2 et 3 fois plus grandes dans le cas de la modulation de pH (Tableau 7).

Tableau 7. Récapitulatif des différentes structures observées à différents pH

pH	7,4	5,2	4,5 → 7,4
Type de structures observées	A = (1,5 ± 0,2) nm	--	A = (1,2 ± 0,2) nm
	P = (51,4 ± 11,0) nm	--	P = (136 ± 43) nm
	--	--	A = (2,5 ± 0,7) nm
	--	--	P = (94 ± 22) nm
	--	--	A = (5,0 ± 0,3) nm
			P = --

A : amplitude et P : périodicité

Lorsque nous avons caractérisé cette phase grise fibreuse, nous avons pu observer une grande variation de la périodicité de ces fibres (Figure 67), ainsi, même si les périodicités ne concordent pas, nous pouvons néanmoins supposer que les fibres de faibles amplitudes formées à pH 7,4 et après modulation du pH sont de la même nature.

De plus, nous remarquons que les fibres épaisses n'apparaissent que dans le cas où les formes dimériques et monomériques sont présentes, ainsi nous pouvons présumer que les structures fines observées dans les suivis à différents pH sont composées d'hématine monomérique, alors que les fibres épaisses caractérisées lors d'un traitement acide, pourraient être de nature dimériques. Le fait de n'observer aucune fibre lors de l'injection de la solution d'hématine à pH acide, montre que la détoxification de l'hématine est liée à la capacité de celle-ci à s'insérer dans les membranes.

Dans la course au développement de nouvelles cibles antipaludiques, l'inhibition du mécanisme de la formation de l'Hz est une cible intéressante et très utilisée dans la lutte contre le paludisme. En effet, les premiers médicaments antipaludéens, issus de la famille des quinoléines, ciblaient déjà le processus de détoxification de l'hématine. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à visualiser l'influence d'un de ces antipaludéens sur l'insertion de l'hématine dans les bicouches lipidiques.

II.4. Effet d'un antipaludéen, la chloroquine, sur l'interaction entre l'hématine et les bicouches lipidiques

La chloroquine (CQ) est une molécule antipaludique synthétique appartenant à la famille des Amino-4-quinoléines. Bien que celle-ci soit utilisée comme molécule antipaludique depuis la fin de la seconde guerre mondiale (Giroud et al, 1978), des questions sur son mécanisme d'action restent encore en suspens (Casabianca et al, 2008).

D'après les données bibliographiques, la CQ perturberait l'équilibre établi entre les formes monomériques et dimériques de l'hématine (Figure 70) en se fixant préférentiellement sur les dimères μ -oxo (Alumasa et al, 2011; Casabianca et al, 2008). Ainsi, le complexe CQ-hématine formé conduirait indirectement à la lyse de la membrane du parasite.

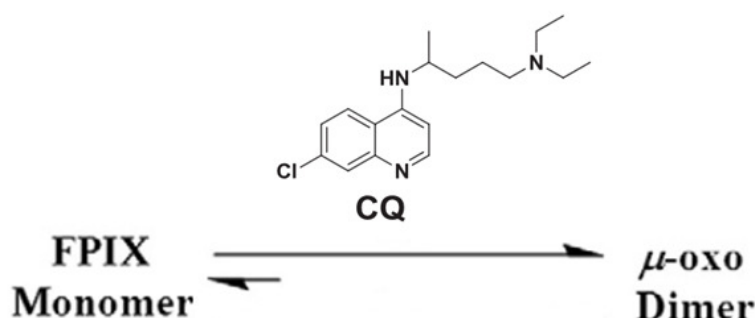


Figure 70. Intervention de la Chloroquine (CQ) dans l'équilibre entre monomères et dimères d'hématine
La CQ, perturberait l'équilibre entre les formes monomériques et dimériques de l'hématine en se fixant sur les dimères μ -oxo. D'après (Alumasa et al, 2011)

Afin de déterminer les doses en chloroquine nécessaire pour inhiber la formation de la β -hématine, nous avons, dans un premier temps, mesuré la concentration de l'hématine libre, après ajout de différentes concentrations de CQ. Pour cela, l'hématine est incubée dans le tampon de polymérisation précédemment décrit (tampon acétate pH 4,5) pendant 2 heures à 60°C en présence de CQ, à différentes concentrations. Sur la Figure 71, nous pouvons déterminer sur la courbe de dose-réponse typique, d'allure sigmoïdale, une IC_{50} ³² de 0,9 équivalent en hématine, en concordance avec la littérature (Egan & Ncokazi, 2005).

³² Concentration en CQ pour laquelle nous obtenons une inhibition de 50 % de la formation de la β -hématine

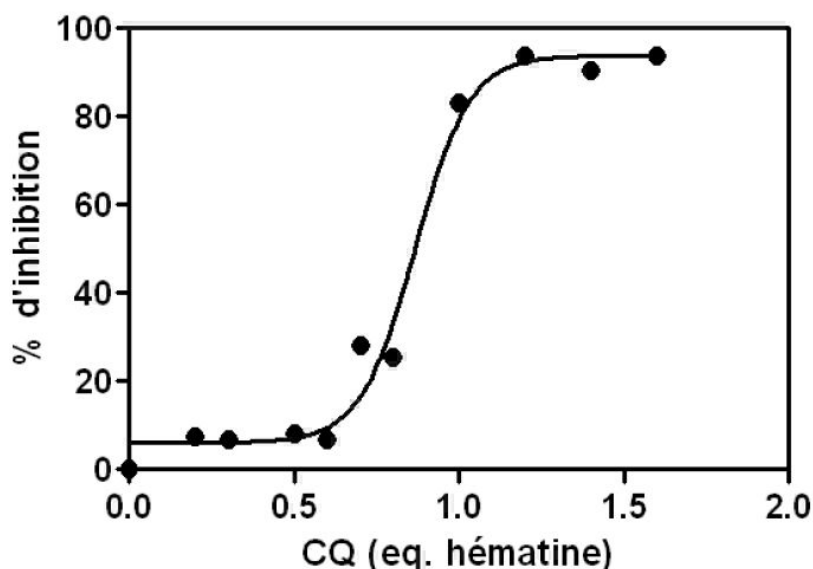


Figure 71. Inhibition de la formation de la β -hématine en présence de la CQ

L'hématine est incubée dans le tampon acétate pendant 2 heures à 60 °C en présence de différentes concentrations de CQ. L'hématine libre est ensuite dosée par ajout de la pyridine puis l'absorbance est mesurée à 405 nm. La concentration en CQ est divisée par la concentration initiale en hématine pour être exprimée en équivalent hématine.

Afin de vérifier si l'hématine est capable de former des fibres au sein de la bicouche lipidique en présence de cette molécule antipaludique, nous avons préparé une solution constituée du complexe hématine-CQ à un ratio molaire de 1:1,5. Ainsi, à ce ratio, nous nous plaçons sur le plateau où l'inhibition de l'hématine est totale (Figure 71). Puis, cette solution est injectée sur une membrane de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

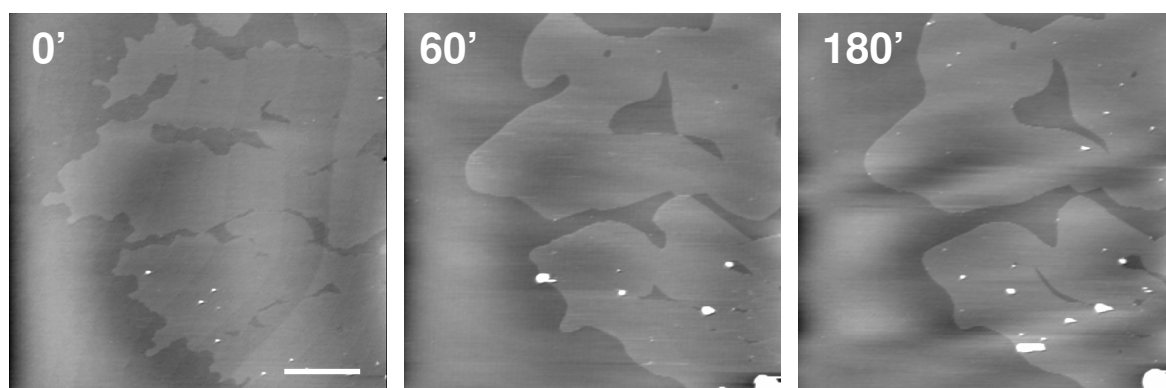


Figure 72. Suivi AFM de l'interaction d'une solution d'hématine + CQ avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

L'hématine, à concentration finale de 10 μ M, diluée dans le tampon Tris 100 mM, pH 7,4 est incubée avec une solution de chloroquine à 15 μ M finale, correspondant approximativement à $1,5 \times IC_{50}$ (concentration pour inhiber 50 % de l'hématine). La solution est ensuite injectée sur une SLB de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). Des images de la même zone sont enregistrées à différents temps d'incubation jusqu'à 180 minutes. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 μ m, échelle en z = 10 nm.

Sur la Figure 72, nous pouvons observer le suivi AFM réalisé après injection de la solution de CQ-hématine 1,5:1 (ratio molaire). Nous pouvons noter que même après 3 heures d'incubation, aucun épaissement ni aucune autre structure fibreuse ne s'est développé au sein de la membrane. Par contre, comme déjà observé précédemment, lors de l'injection de la solution contrôle de tampon Tris 100 mM, nous pouvons constater un remodelage du domaine de DPPC

Ces résultats confirment donc que la CQ empêche l'insertion de l'hématine dans les bicouches lipidiques planes. Ainsi, d'après les données bibliographiques sur le mode d'action de la CQ, qui suggèrent que sa fixation sur les dimères μ -oxo empêcherait la formation du cristal inerte, et nos résultats, nous pouvons supposer que l'inhibition de l'Hz montre que l'insertion de l'hématine dans la membrane lipidiques est nécessaire et primordiale pour la formation de ce cristal inerte. En effet, il est très probable que la nucléation et le développement de ces fibres au sein de la membrane soit à l'origine de la formation du plus cristal d'Hz. En favorisant l'équilibre vers la dimérisation (Figure 70), l'hématine perd totalement son pouvoir membranotrope empêchant ainsi la nucléation de ces fibres.

II.5. Conclusions

Le mécanisme de détoxification de l'hématine, nous l'avons vu, est donc un processus extrêmement complexe influencé par divers paramètres critiques (pH, concentration en hématine, présence ou non de lipides...).

En effet, les expérimentations réalisées par la technique de Langmuir, nous ont permis de démontrer que l'insertion de l'hématine dans des monocouches de POPC était modulée par le pH : à pH 5,2, l'hématine est incapable de pénétrer dans les monocouches lipidiques alors que le pH 7,4 favorise son insertion. En fait le pH influence fortement l'état d'équilibre entre les formes monomériques et dimériques de l'hématine. Les formes dimériques, favorisées par l'acidification du pH ne peuvent pénétrer dans les structures lipidiques alors que l'hématine monomérique, majoritaire à pH neutre, conserve toute ses propriétés membranotropes. Grâce à la visualisation de l'interaction de l'hématine avec des bicouches lipidiques via l'AFM, nous avons pu constater que cette insertion conduisait à la formation de structures fibreuses périodiques, probablement des précurseurs de l'Hz. Ces suivis dans le temps, nous ont permis

de caractériser divers types de fibres : celles formées par l'insertion de l'hématine sous forme monomérique, et celles qui se développent sur la membrane, beaucoup plus épaisses. Nous avons remarqué que la croissance de ces fibres se produit toujours à partir de l'interface fluide/gel, par un épaississement des bords. Cette ligne de tension, où une partie des chaînes aliphatiques des molécules de DPPC est exposée au milieu aqueux, constitue donc une zone favorable d'interaction avec l'hématine afin d'établir le point de nucléation des fibres précurseur du cristal d'Hz. Ainsi cette zone d'hydrophobicité au niveau de la bicouche lipidique, favoriserait d'une part son insertion au sein de la membrane et d'autre part la stabilisation de ces monomères par des liaisons de coordination favorisant la nucléation de ces structures fibreuses (Hempelmann et al, 2003).

De plus, en étudiant la cinétique de polymérisation de l'hématine nous avons pu montrer d'une part le rôle catalyseur des lipides sur cette réaction et d'autre part que l'augmentation du degré de polymérisation provoque une diminution de l'activité membranotrope de l'hématine due à la diminution des formes monomériques.

Il apparaît clair maintenant que le mécanisme de détoxification fait intervenir les différentes formes d'hématine qui ont, à chaque étape de ce processus, un rôle clé. Ainsi l'équilibre entre les formes monomériques et dimériques de l'hématine est l'élément central dans le processus de détoxification dont la perturbation entraîne la lyse du parasite. Après la dégradation de l'Hb, l'hème libérée est immédiatement oxydée en monomères d'hématine (Gorka et al, 2013).

Nous l'avons vu à travers les différents suivis d'AFM, que la concentration de l'hématine influence énormément l'intégrité de la membrane lipidique. Ainsi, une concentration trop élevée en hématine entraînera la lyse très rapide de la membrane empêchant qu'elle serve de support pour l'élaboration de fibres d'hématine qui aboutiront à la formation du cristal inerte. La régulation de l'activité protéolytique des enzymes responsables de la digestion de l'Hb et par conséquent de la libération du ferriprotoporphyrine IX (l'hématine monomérique) est donc un élément crucial pour éviter la lyse du parasite.

L'étude sur l'insertion de l'hématine en présence d'une molécule antipaludique, la chloroquine, nous a permis également de mieux comprendre ce processus de détoxification et d'appréhender le rôle des différentes formes d'hématine impliquées dans ce mécanisme. En

effet, d'après les expérimentations AFM, l'ajout de la CQ inhibe l'insertion de l'hématine dans les membranes lipidiques en se fixant sur les dimères μ -oxo. Ainsi, la déstabilisation de l'équilibre entre les formes monomériques et dimériques de l'hématine conduit à la lyse du parasite.

En conclusion, l'inhibition du mécanisme de la formation de l'Hz fondé sur l'insertion de l'hématine dans les membranes lipidiques pourrait être une nouvelle cible intéressante pour le développement des nouvelles molécules antipaludiques capables de perturber le pouvoir membranotrope de l'hématine. En effet, l'utilisation massive de certains antipaludéens, dont la chloroquine fait partie, a provoqué l'apparition de nouvelles espèces de parasites multi-résistantes vis-à-vis de ces molécules (Le Bras et al, 2006). Ainsi, des molécules perturbant l'équilibre monomères/dimères³³, constitueraient de nouvelles pistes pour l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques. Le pouvoir membranotrope menant à la lyse des membranes pourrait tout aussi être intéressant pour le développement de médicaments antipaludiques en perturbant par exemple la régulation de l'activité protéolytique des enzymes responsables de la digestion de l'Hb. Ainsi, la dégradation massive de l'Hb conduisant à la libération d'une certaine quantité d'hématine qui nous l'avons vu, à forte concentration provoque la lyse des membranes.

³³ Soit en se fixant à l'une des entités d'hématine (monomère, dimère π - π , dimère μ -oxo ou dimère stable), soit en bloquant les pompes à protons des vésicules cytosomales ou de la vacuole digestive responsables de l'acidification du pH

Chapitre III. Interaction des NPs de TiO₂ avec des modèles membranaires biomimétiques

Les NPs de TiO₂, nous l'avons vu dans la partie bibliographique, sont des produits manufacturés utilisés dans de nombreuses applications. Les risques d'expositions étant donc avérés, nous nous sommes intéressés aux interactions potentielles de ces agents exogènes avec les barrières biologiques, que constituent les membranes lipidiques. Ainsi, nous nous sommes interrogés sur les effets éventuels de ces NPs de TiO₂, après inhalation, sur les vésicules du surfactant pulmonaire et après ingestion/contact cutané, sur les membranes plasmiques des cellules.

III.1. Interaction des NPs de TiO₂ avec des modèles lipidiques du surfactant pulmonaire

Le surfactant pulmonaire, fluide tapissant les alvéoles pulmonaires, est composé à 90 % de lipides (Creuwels et al, 1997). Il a pour rôle de stabiliser la tension de surface des alvéoles pulmonaires durant la respiration en la maintenant proche de 1 mN/m (Perez-Gil and Weaver 2010), protégeant ainsi celles-ci du collapse en fin d'expiration. Ce surfactant pulmonaire, d'environ 200 nm d'épaisseur, présente à l'interface air/liquide une monocouche lipidique et dans la partie liquide, des vésicules lipidiques, intervenant dans la dynamique de renouvellement des lipides à l'interface (Perez-Gil & Weaver, 2010). Après inhalation de NPs de TiO₂, celles-ci peuvent rejoindre les alvéoles pulmonaires, traverser la monocouche lipidique à l'interface air/liquide et se retrouver immergées dans ce surfactant pulmonaire. Dans ce contexte, il a été suggéré récemment que l'exposition aux NPs pouvait aggraver ou même induire des maladies respiratoires (Lanone & Boczkowski, 2011; Oberdörster, 2000), mais les mécanismes d'action demeurent inconnus. Il a été également montré que les NPs de TiO₂ pouvaient altérer les fonctions biophysiques du surfactant pulmonaire, probablement par une modification structurale (Schleh et al, 2009). Ainsi, face à ce constat, nous nous sommes proposés d'étudier et d'identifier les mécanismes d'interaction moléculaires entre les NPs de

TiO₂ et les vésicules du surfactant pulmonaire, en utilisant les modèles membranaires biomimétiques.

Notre choix s'est porté sur un système binaire simple permettant d'avoir une ségrégation de phase à température ambiante. Le DPPC, représentant plus de 50 % des lipides du surfactant chez l'homme (Postle et al, 2001), a naturellement été choisi pour mimer les membranes des vésicules du surfactant pulmonaire (Goerke, 1998). A ce phospholipide ayant un très haut niveau d'organisation à 37°C, nous avons choisi de l'associer au DOPC à un ratio équimolaire, préservant ainsi les proportions physiologiques. Le mélange de DOPC/DPPC a l'avantage majeur d'être très renseigné dans la littérature et de présenter une ségrégation de phase à température ambiante.

III.1.1. Organisation des NPs en présence de vésicules lipidiques

La taille des NPs est un élément de caractérisation clé dans les études de toxicité (Gurr et al, 2005). En effet, la dimension nanométrique de ces particules peut conduire à l'apparition de nouvelles propriétés (Beydoun et al, 1999) dont les effets de surface font partie. De plus, d'autres travaux ont montré que la nature du milieu influencerait la dispersion de ces NPs (Sager et al, 2007). Nous nous sommes donc proposés, dans un premier temps, de mesurer le diamètre de ces NPs en absence et en présence de lipides, grâce à des images réalisées au MEB, afin d'évaluer l'influence des lipides sur leur dispersion.

Les NPs de TiO₂, à une concentration finale de 200 µg/mL, sont tout d'abord incubées avec ou sans SUVs de DPPC avant d'être séchées pour permettre l'imagerie au MEB. Pour préserver la structure des membranes déshydratées par l'opération de séchage, du glucose est ajouté à la solution d'analyse.

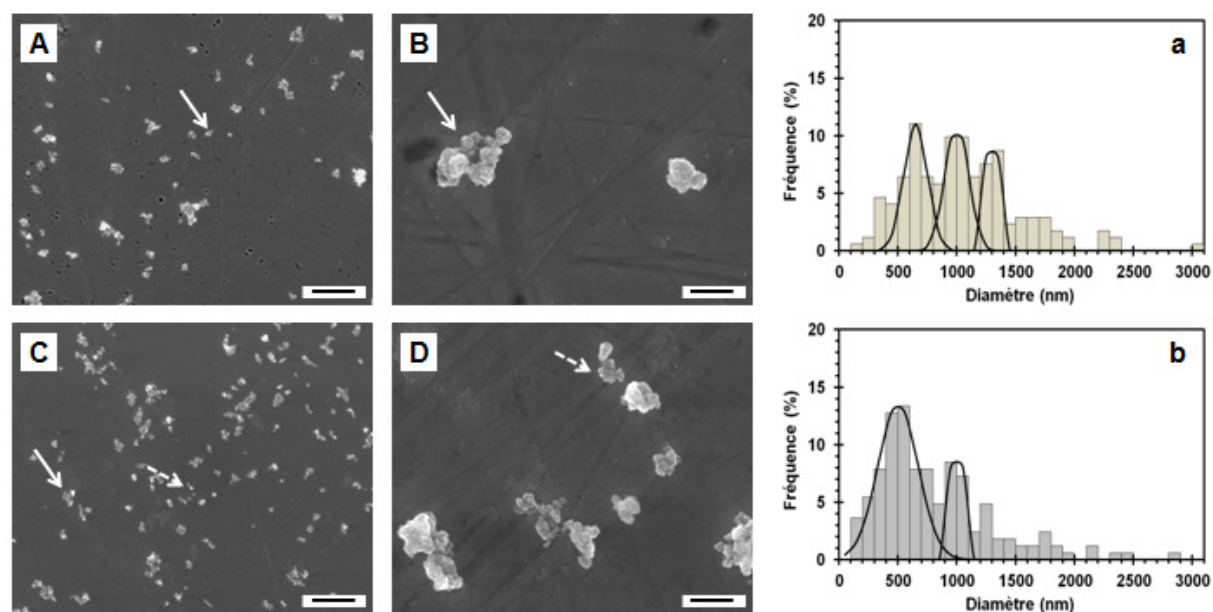


Figure 73. Visualisation par MEB des NPs d'anatase en absence ou en présence de SUVs de DPPC

La solution d'analyse, composée de 1,5 mM de SUVs, 200 µg/mL de NPs d'anatase et 5µM de glucose, est déposée sur un support en acier puis séchée avant d'être observée par MEB. Les images correspondent aux échantillons en absence de lipides (A & B) ou en présence de SUVs de DPPC (C & D). Les flèches pleines indiquent des agrégats de NPs d'un diamètre supérieur à 2 µm et les flèches en pointillés montrent celles caractérisées par un diamètre inférieur à 1 µm. Barre d'échelle = 20 µm pour A et C et = 2 µm pour B et D. La distribution de tailles des agrégats observés est représentée en absence (a) ou en présence (b) de vésicules lipidiques de DPPC.

Les images obtenues en MEB des NPs en absence de lipides (Figure 73 A et B), montrent une grande diversité de taille de ces structures. En effet, nous pouvons visualiser des NPs totalement agrégées ou agglomérées d'un diamètre allant de 1 à 2 µm. L'analyse de la distribution des tailles de ces NPs permet de discerner trois populations (Figure 73 a) : (650 ± 100) nm, (1000 ± 100) nm et (1300 ± 50) nm. Par contre, en présence de liposomes de DPPC, la taille des NPs semble plus homogène, même si la présence de gros agrégats ou agglomérats subsiste (Figure 73 C et D). Les histogrammes de distribution de tailles des NPs de TiO₂ révèlent l'existence de deux populations, dont une majoritaire à (500 ± 170) nm. La présence de lipides favoriserait ainsi légèrement la dispersion des NPs de TiO₂.

Afin de confirmer ces résultats, une autre technique de caractérisation mesurant la taille de particules directement en suspension, la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic light Scattering* en anglais, DLS) a été utilisée. Les diamètres moyens des NPs, ont été également évalués en présence et en absence de liposomes de DPPC. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Comparaison des diamètres des NPs d'anatase mesurés par DLS et à partir des images MEB

	NPs TiO ₂ seules	NPs TiO ₂ + SUVs de DPPC
DLS	(710 ± 92) nm	(524 ± 102) nm
MEB	(650 ± 100) nm	(500 ± 170) nm

Les diamètres signalés à partir des images MEB correspondent au pic majoritaire déterminé par les histogrammes de distribution (Figure 73 a et b).

DLS : diffusion dynamique de la lumière et MEB : microscopie à balayage

Les résultats des mesures des diamètres des NPs de TiO₂ en présence et en absence de lipides sont concordants et montrent tous deux l'effet dispersant des liposomes sur l'état d'agrégation ou d'agglomération des NPs d'anatase. Une hypothèse possible expliquant ce phénomène serait l'établissement d'interactions électrostatiques entre les liposomes et les NPs. En effet, à pH 7,4 (pH auquel nous travaillons), les NPs sont chargées négativement et les molécules de DPPC, constituant les liposomes, même s'ils sont zwitterioniques, possèdent une charge positive (choline) au niveau de leurs têtes polaires. Ainsi, ces interactions électrostatiques seraient plus fortes que les forces impliquées dans la formation d'agglomérats.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes proposés de quantifier l'adsorption des liposomes sur les NPs de TiO₂. Pour cela, les NPs d'anatase à différentes concentrations (de 0 à 2000 µg/mL) sont incubées 30 minutes avec des LUVs à 10 µM de DOPC/DPPC. Dans ces liposomes est encapsulée une sonde fluorescente, la calcéïne, qui nous permettra de quantifier le taux de vésicules adsorbées aux NPs. Après centrifugation, le surnageant est prélevé et la fluorescence est mesurée après ajout de Triton X-100 (TX-100). Ainsi, la différence d'intensité de fluorescence entre les échantillons avec et sans NPs est calculée, et le pourcentage de liposomes adsorbés avec les NPs culottées peut être déterminé.

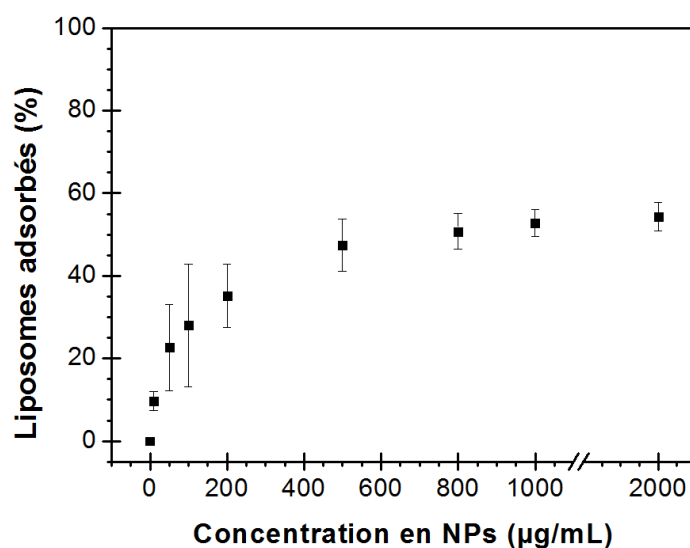


Figure 74. Adsorption des liposomes sur les NPs de TiO₂ après centrifugation

Les liposomes de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) à 10µM contenant la calcéine et les NPs, à différentes concentrations, sont incubés avant d'être centrifugés. Le surnageant est prélevé et l'intensité de fluorescence des liposomes restant en suspension est mesurée. Les expérimentations ont été réalisées en triplicata ; chaque point représente la moyenne de ces 3 expériences indépendantes.

Sur la Figure 74, nous pouvons observer que le pourcentage de liposomes adsorbés augmente avec la concentration en NPs de TiO₂ jusqu'à atteindre 50 % à partir d'une concentration en NPs à 500 µg/mL. Il apparaît clairement, à l'issue de ces résultats, que les NPs d'anatase interagissent bien avec les liposomes, probablement par l'établissement d'interactions électrostatiques, comme l'ont suggéré certains travaux (Dawson et al, 2009; Frost et al, 2012).

Afin d'évaluer la perturbation potentielle des lipides membranaires provoquée par ces interactions, nous nous sommes intéressés aux effets induits par les NPs de TiO₂ sur l'intégrité membranaire (perméabilisation de la membrane) et sur l'état physique de ces membranes, après exposition.

III.1.2. Influence des NPs de TiO₂ sur l'intégrité membranaire

III.1.2.1. Influence des NPs de TiO₂ sur la perméabilité membranaire

Dans un premier temps, nous avons donc évalué la capacité des NPs d'anatase à lyser, ou tout du moins à perméabiliser les membranes mimant les vésicules du surfactant pulmonaire. Pour cela, nous avons encapsulé la calcéine dans des LUVs de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) que nous avons incubé 30 minutes avec des NPs à différentes concentrations. La fluorescence a

été ensuite mesurée puis comparée avec la fluorescence obtenue après lyse totale des liposomes, après ajout du TX-100. Les résultats représentant le pourcentage de calcéine libéré après exposition aux NPs sont présentés dans la Figure 75.

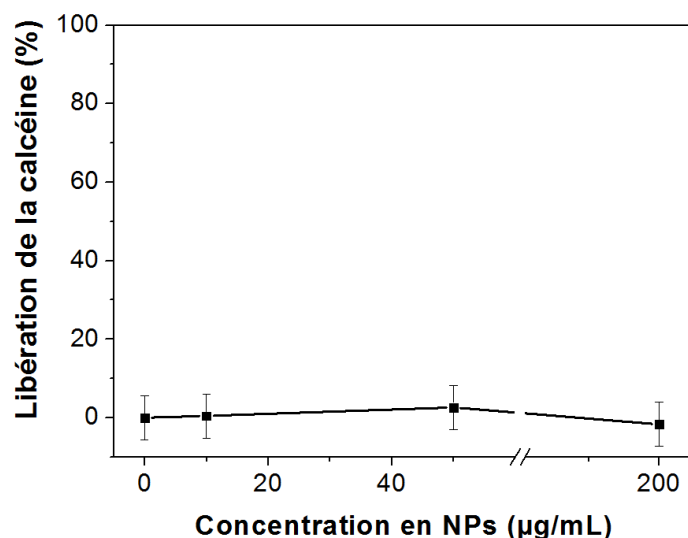


Figure 75. Mesure de la perméabilité membranaire en présence de NPs de TiO₂

La calcéine est encapsulée dans des LUVs de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) à la concentration finale de 10 µM. La fluorescence est mesurée après 30 minutes d'incubation avec les NPs de TiO₂ et divisée par la fluorescence émise après lyse totale des vésicules, après ajout du TX-100. Les expérimentations ont été réalisées en triplicata ; chaque point représente la moyenne de ces 3 expériences indépendantes.

Sur cette figure nous pouvons remarquer que la présence de NPs de TiO₂ jusqu'à 200 µg/mL ne perméabilise pas les membranes de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). La concentration en NPs étant déjà très élevée à 200 µg/mL, nous supposons alors que les NPs d'anatase, dans nos conditions, ne provoquent pas la perméabilisation des membranes.

III.1.2.2. Influence des NPs de TiO₂ sur la fluidité membranaire

Bien que les NPs de TiO₂ ne perméabilisent pas les membranes lipidiques, de nombreux travaux ont démontré que des NPs hydrophobes ou hydrophiles pouvaient influencer la distribution latérale des lipides ainsi que la fluidité membranaire du surfactant pulmonaire ou de modèles associés (Guzmán et al, 2012; Sachan et al, 2012; Tatur & Badia, 2011). De plus, d'autres travaux ont montré l'influence de la charge des NPs sur l'état de phase des membranes (Wang et al, 2008).

Ainsi, nous avons suggéré d'évaluer l'influence des NPs de TiO₂ sur les propriétés physiques des membranes. Pour cela, nous avons utilisé deux sondes fluorescentes, le Laurdan, s'intercalant au dessous du squelette de glycérol (Parasassi & Gratton, 1995), et le Prodan, positionnant son groupement fluorescent au niveau des têtes polaires des lipides (Weber & Farris, 1979), toutes deux sensibles à la présence de molécules d'eau. En effet, la pénétration de l'eau dans la bicouche lipidique est directement reliée à l'espace disponible entre les lipides. Ainsi, plus l'état de compaction des lipides membranaires est grand, moins les molécules d'eau sont en contact direct avec les sondes fluorescentes enfouies dans la membrane. L'intensité de fluorescence de ces sondes traduit donc l'état de fluidité/compaction de la membrane lipidique. A partir des intensités de fluorescence mesurées, le GP peut être calculé (Bagatolli & Gratton, 1999; Parasassi et al, 1991) (voir aussi, la partie Matériels et Méthodes, II.2. Spectroscopie de fluorescence). Les mesures des GP des deux sondes fluorescentes ont été réalisées à différentes températures de 10 à 70°C, en présence de différentes concentrations de NPs d'anatase et, sur des liposomes de différentes compositions (DPPC pur et un mélange de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire)).

En ce qui concerne la composition de DPPC pur, nous pouvons remarquer, sur la Figure 76 A et B, que la présence de NPs de TiO₂ n'influence pas la température de transition de phase du lipide (40°C) et ce, quelle que soit la concentration en NPs. Globalement, nous pouvons noter, pour les deux compositions lipidiques, un effet de la température accompagné d'un effet de la concentration en NPs aussi bien pour le GP du Laurdan (GP_L) que pour le GP du Prodan (GP_P). Effectivement, sur les quatre graphiques, nous pouvons observer que l'augmentation de la température accentue les écarts entre les GPs mesurés en absence et en présence de NPs, traduisant une augmentation d'ordre au niveau des têtes polaires (augmentation du GP_P) ainsi que des chaînes aliphatiques (accroissement du GP_L) des lipides. Ainsi, pour le DPPC pur, l'augmentation d'ordre au niveau des chaînes aliphatiques est significative à partir de 40°C et pour le mélange de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) à partir de 35°C. Ces résultats suggèrent que la présence de NPs induit un gain d'ordre au niveau des chaînes aliphatiques des lipides lorsque les phospholipides sont en phase fluide. De plus, cet effet est d'autant plus accentué que la concentration en NPs augmente. En ce qui concerne les variations de fluorescence de la sonde Prodan, nous pouvons observer que l'augmentation d'ordre au niveau des têtes polaires est significative à partir d'une concentration de 50 µg/mL, les variations des GPs en absence et en présence de NPs à 10 µg/mL étant semblable. A une concentration en NPs de 200

µg/mL, nous pouvons constater que l'augmentation de l'ordre au niveau des têtes polaires est significative quelle que soit la température, et ce, même si les lipides sont en phase gel, à l'inverse des expérimentations avec la sonde Laurdan (Figure 76 B et D). Néanmoins, comme avec le Laurdan, à partir de la température de transition de phase des lipides, cet effet est accentué (les variations de GPs sont plus importantes).

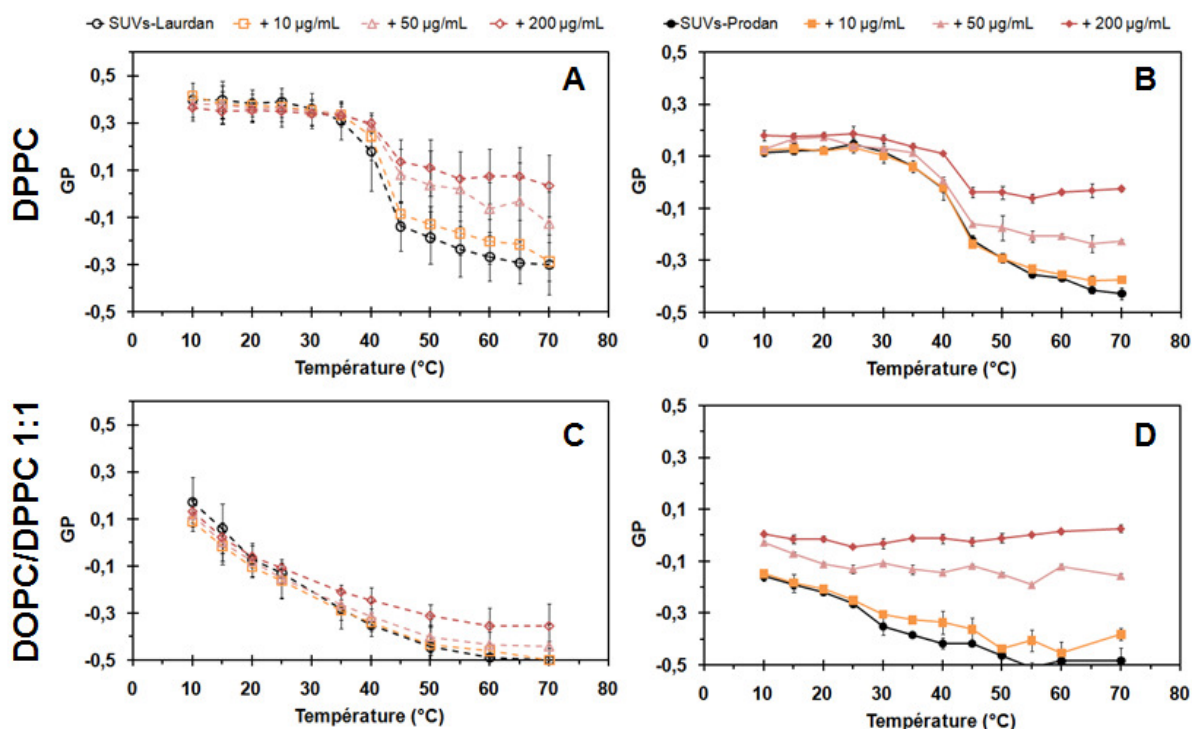


Figure 76. Mesure de la variation du GP des sondes Laurdan et Prodan sous l'influence des NPs de TiO₂
 Deux compositions lipidiques contenant du DPPC ont été testés : DPPC pur (A et B) et un mélange de DOPC/DPPC (C et D). Pour chaque composition, la variation des GPs des sondes fluorescentes de Laurdan (A et C), caractérisé par les courbes en pointillés, et de Prodan (B et D), défini par les courbes pleines, est mesurée. L'effet de la concentration en NPs a également été évalué en réalisant les expérimentations en présence de NPs d'anatase de 0 à 200 µg/mL. Les expérimentations ont été réalisées en triplicata ; chaque point représente la moyenne de ces 3 expériences indépendantes. Les compositions lipidiques sont indiquées en ratio molaire.

Les modulations du GP_L et du GP_P ont mis en évidence la capacité des NPs de TiO₂ à augmenter l'ordre des lipides membranaires. Néanmoins, cet effet est modulé par la température, la composition lipidique, l'état physique initial de la membrane et semble être plus accentué au niveau des têtes polaires. Afin de mieux apprécier ces variations de GP, nous avons déterminé la variation de GP (ΔGP) correspondant à la différence entre le GP mesuré en présence de NPs (à 200µg/mL) et celui mesuré en absence de NPs à 35°C (en se rapprochant de la température physiologique de 37°C). Les résultats sont présentés dans la Figure 77.

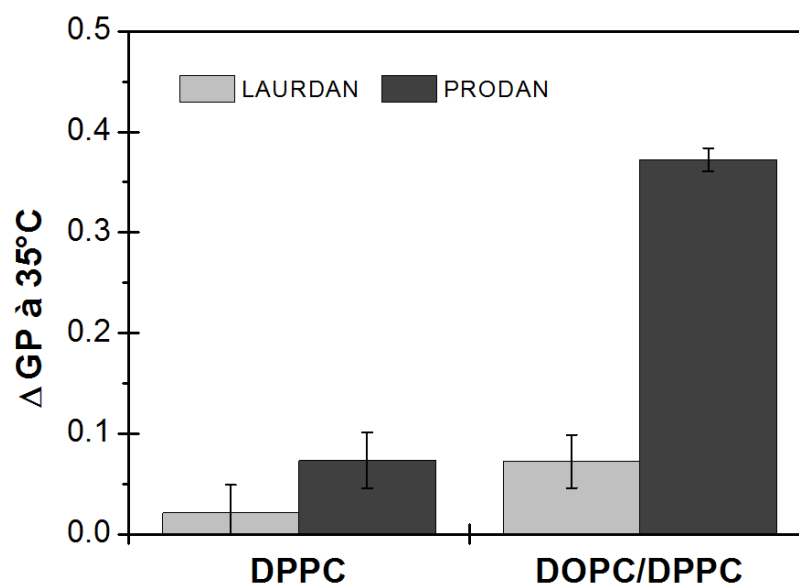


Figure 77. Variation de l'ordre membranaire à 35°C induite par la présence de NPs de TiO₂ à 200μg/mL
 Variation du GP_L (en clair) et du GP_P (en foncé) correspondant à la différence entre le GP mesuré en présence de NPs (à 200μg/mL) et celui mesuré en absence de NPs, à une température définie proche de la température physiologique (37°C).

Brièvement, il apparait clairement que la variation du GP_P est significativement plus importante (3 à 4 fois plus élevée) par rapport au GP_L à 35°C. Ainsi, à cette température, l'interaction des NPs se ferait plutôt avec les têtes polaires des lipides, au niveau desquels elles induisent une augmentation d'ordre membranaire. En effet, les molécules de DPPC, à 35°C, étant en phase gel, l'état de compaction est tel que les chaînes hydrophobes sont déjà très ordonnées. Ainsi, la variation de l'accessibilité aux molécules d'eau ne peut être que très faible.

En ce qui concerne le gain d'ordre révélé par les sondes de Prodan, celui-ci pourrait être dû à une diminution de l'accessibilité de l'eau aux lipides des LUVs adsorbées à la surface d'agglomérats de NPs ou bien à un effet physique des NPs de TiO₂ sur l'ordre des lipides comme l'ont suggéré l'équipe de Granick (Wang et al, 2008). En effet, les auteurs ont montré que les NPs anioniques induiraient une « gélotion » locale en établissant des interactions de type dipôle-dipôle avec la tête polaire de phosphocholine. Ces interactions conduiraient à un redressement de la tête polaire s'orientant ainsi perpendiculairement au plan de la bicouche (Wang et al, 2008).

Les expérimentations précédentes ont montré clairement une interaction entre les NPs de TiO₂ et le mime des vésicules du surfactant pulmonaire : adsorption des SUVs avec des agglomérats/ agrégats de NPs, pouvoir dispersant des liposomes sur la taille des particules, perturbation de la fluidité membranaire, probablement dus à l'établissement d'interactions électrostatiques. Afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, nous nous sommes proposés de visualiser les effets induits par les NPs sur des SLBs de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire), mimant les vésicules du surfactant pulmonaire, par AFM.

III.1.3. Visualisation des changements morphologiques de bicouches lipidiques après exposition aux NPs

Dans cette partie, les NPs d'anatase sont suspendues dans du Tampon TBS à une concentration de 10 mg/mL. La suspension mère est ensuite soniquée pendant 15 minutes afin de dissocier les plus gros agglomérats. La suspension est ensuite gardée à l'obscurité jusqu'au lendemain. Avant chaque expérimentation, la suspension mère subit une autre sonication avant d'être diluée dans du tampon TBS à différentes concentrations finales de 50 à 200 µg/mL. Les échantillons de NPs sont ensuite déposés au contact de SLBs et incubés de 30 minutes à 2h30 avant d'être rincés afin de pouvoir être imagé.

III.1.3.1. Effet de la concentration en NPs

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'effet de la concentration en NPs d'anatase, en incubant les SLBs avec une concentration croissante en NPs de 50 à 200 µg/mL pendant 30 minutes. Les échantillons sont rincés avec du tampon TBS afin d'enlever tous résidus de NPs pour pouvoir imager les bicouches planes correctement. Sur la Figure 78, nous pouvons observer qu'après 30 minutes d'incubation avec les NPs, la différence de hauteur entre phase gel, enrichie en DPPC et phase fluide, enrichie en DOPC est préservée. En effet, les domaines de DPPC sont surélevés de $1,1 \pm 0,1$ nm par rapport à la DOPC avant l'addition des NPs et celle-ci demeure inchangée après incubation et rinçage.

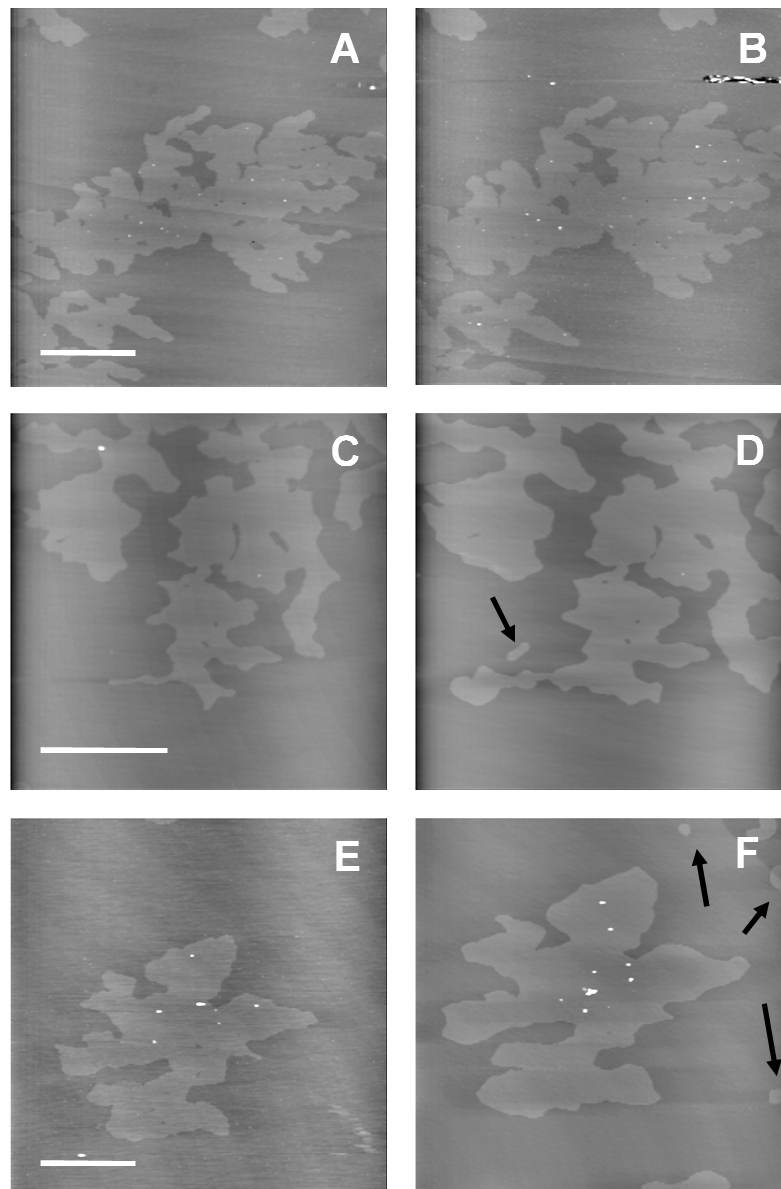


Figure 78. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO₂ à 21°C.

Les bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) sont imagées avant (A, C et E) et après incubation (B, D et F) pendant 30 minutes avec des NPs d'anatase à 50 µg/mL (D), ou 200 µg/mL (F). Après incubation, les bicouches sont rincées avec du tampon TBS pour enlever les NPs et pouvoir imager les SLBs. Une SLB est traitée sans l'exposition aux NPs (B) afin d'évaluer l'effet de l'étape de rinçage sur les changements topographiques de l'échantillon. Les flèches blanches indiquent l'apparition de nouveaux domaines après exposition aux NPs. Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 10 µm, échelle en z = 10 nm.

Nous pouvons également noter un grossissement global du domaine initial de DPPC et ce même en l'absence de NPs. En effet, les images A et B de la Figure 78, montrent une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) ayant subi les mêmes étapes d'injection, d'incubation et de rinçage sans avoir été exposée aux NPs. Celles-ci nous permettent donc d'évaluer l'influence de ces différentes « perturbations » sur les changements topographiques

de l'échantillon. L'image avant et après exposition aux NPs montre un grossissement du domaine initial de DPPC de l'ordre de 15 %. Cet effet serait probablement dû aux injections successives qui pourraient alors perturber la membrane. Une autre explication serait un effet de la température. En effet, un grossissement des domaines en phase gel peut être observé en diminuant la température. Néanmoins, durant l'expérimentation nous nous assurons de rester à une température de 21°C et nous ne faisons l'acquisition de l'image 15 minutes après avoir rincé afin de stabiliser la membrane à la température du tampon et d'éviter les effets de chauffe du laser.

Cependant, nous pouvons constater qu'en présence de NPs, que ce soit à 50 µg/mL ou 200 µg/mL, de nouveaux domaines en phase gel apparaissent (flèches de la Figure 78). Afin de confirmer l'implication des NPs dans la redistribution des lipides, nous avons choisi de moduler le ratio molaire du mélange de DOPC/DPPC afin de générer une bicouche sans domaine en phase gel. D'après les résultats obtenus dans la partie I.2. Influence du pourcentage lipides saturés/lipides insaturés, avec un mélange de DOPC/DPPC 3:1 (ratio molaire), c'est-à-dire avec 25 % de DPPC, les molécules de DPPC sont dispersées dans la phase fluide et ne sont pas capable de former des domaines en phase gel.

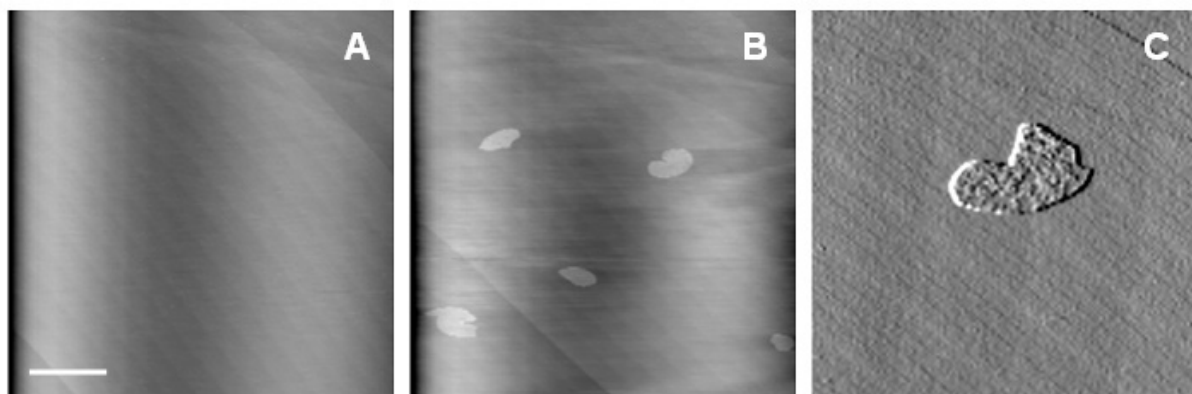


Figure 79. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 3:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 1 heure avec des NPs de TiO₂ à 21°C.

La bicouche de DOPC/DPPC 3:1 (ratio molaire) est imagée avant (A) et après incubation (B) pendant 30 minutes avec des NPs d'anatase à 200 µg/mL. Après incubation, la bicouche est rincée avec du tampon TBS pour enlever les NPs et pouvoir imager la SLB. Un grossissement d'un domaine formé est réalisé (image de 15 µm × 15 µm), l'image de déflexion correspondante est présentée en C. Barre d'échelle = 10 µm. Echelle en z = 10 nm pour les images A et B et z = 0,01 V pour l'image C.

Cette SLB est ensuite incubée avec des NPs de TiO₂ à 200 µg/mL pendant 1 heure avant d'être rincée puis imagée à l'AFM. Les résultats sont présentés dans la Figure 79. Après

exposition aux NPs nous pouvons observer l'apparition de nouveaux domaines surélevés par rapport au DOPC et donc probablement des domaines en phase gel. Ainsi, les NPs auraient provoqué une redistribution des molécules de DPPC dispersées dans la phase fluide pour les regrouper en domaines. Un grossissement des domaines (image de déflexion présentée en Figure 79 C), montre une hétérogénéité dans l'épaisseur de ceux-ci avec des différences de hauteur de 1,0 à 1,8 nm par rapport au DOPC. Le temps d'incubation ayant été doublé pour cette expérimentation (de 30 minutes à 1 heure), nous avons décidé d'étudier l'effet du temps d'incubation sur les changements topographiques de la membrane induits par l'exposition aux NPs.

III.1.3.2. Effet du temps d'exposition

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'effet de la durée d'incubation, en incubant les SLBs avec une concentration en NPs de 200 µg/mL pendant 2h30. Les échantillons sont ensuite rincés avec du tampon TBS, comme précédemment, afin d'enlever tous résidus de NPs pour pouvoir imager les bicouches planes correctement. Sur la Figure 80, nous pouvons observer qu'après 2h30 d'incubation avec les NPs, un troisième niveau de gris est apparu au sein du domaine de DPPC.

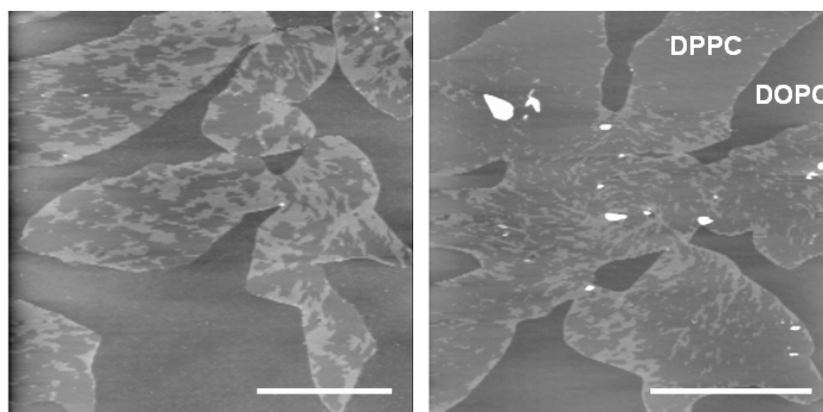


Figure 80. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) après incubation avec des NPs de TiO₂ pendant 2h30 min à 21°C.

Les bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) sont exposées aux NPs d'anatase à 200 µg/mL pendant 2h30. Après incubation, les bicouches sont rincées avec du tampon TBS pour enlever les NPs et pouvoir imager les SLBs. Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 10 µm, échelle en z = 10 nm.

Nous pouvons remarquer sur ces images que cette surélévation, au niveau des domaines de DPPC, n'est pas ciblée et s'entend aussi bien sur les bords du domaine qu'au centre de celui-

ci. De toutes petites zones claires au sein du domaine peuvent être détectées de quelques dizaines de nm de diamètre à des zones plus étendues notamment sur les bords. Un trait de section réalisé sur un grossissement plus important révèle que l'épaississement de la phase gel est de l'ordre de $(1,8 \pm 0,4)$ nm par rapport au DOPC. (Figure 81).

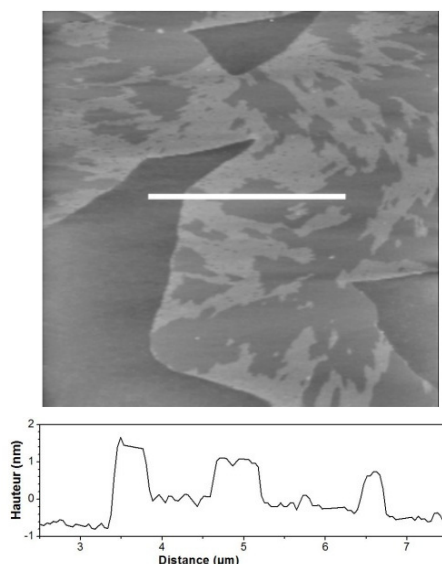


Figure 81. Grossissements de l'épaississement observé sur de domaine de DPPC après incubation avec des NPs de TiO₂ à 200 µg/mL pendant 2h30.

L'épaississement observé en Figure 80, après incubation pendant 2h30 avec suspension de NPs de TiO₂ à 200 µg/mL, est quantifié grâce au trait de section réalisé sur l'image de hauteur ci-contre. Ainsi, les zones épaissies sont surélevées de l'ordre de 1,7 à 2,3 nm par rapport au DOPC. Image de 10 µm × 10 µm ; échelle en z = 10 nm.

Nous pouvons également noter que la différence de hauteur entre la phase gel enrichie en DPPC (non épaissie) et la phase fluide demeure inchangée : $(1,0 \pm 0,1)$ nm. Il s'agit bien donc d'un épaississement de la phase gel de DPPC et non d'un affaissement de celle-ci. Ainsi, une exposition prolongée aux NPs de TiO₂, perturbe de manière évidente les membranes lipidiques, en modifiant leur topographie.

D'après les résultats précédents, présentés sur la Figure 76, nous avons établi un effet de la température sur l'augmentation d'ordre dans la membrane. Ainsi, nous nous sommes proposés de visualiser cet effet également par AFM.

III.1.3.3. Effet de la température

Afin d'évaluer l'influence de la température, les SLBs sont incubées en présence de NPs d'anatase à une concentration finale 200 µg/mL pendant 30 minutes à 37°C. Les échantillons

RESULTATS

sont ensuite refroidis doucement pendant 2 heures jusqu'à atteindre 21°C (température ambiante). Puis ils sont rincés avec du tampon TBS, comme précédemment, afin d'enlever tous résidus de NPs pour pouvoir imager les bicouches planes correctement. Sur la Figure 82, nous pouvons observer, après incubation avec les NPs, que la surélévation du domaine de DPPC s'est étendue à la quasi-totalité de celui-ci. L'épaississement mesuré est du même ordre de grandeur que celui évalué précédemment avec l'augmentation du temps d'incubation.

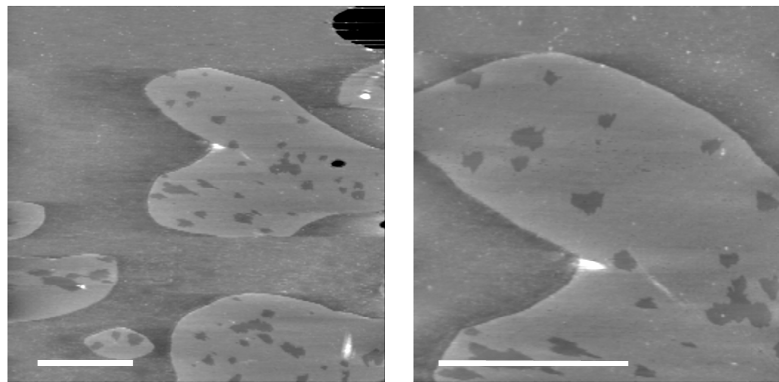


Figure 82. Images AFM de bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) après incubation avec des NPs de TiO₂ pendant 30 min à 37°C puis 2 heures à 21°C.

Les bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) sont exposées aux NPs d'anatase à 200 µg/mL pendant 30 minutes à 37°C puis 2 heures à 21°C. Après incubation, les bicouches sont rincées avec du tampon TBS pour enlever les NPs et pouvoir imager les SLBs. Les résultats sont représentatifs de deux expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 5 µm, échelle en z = 10 nm.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le phénomène observé. L'augmentation de la température favorise l'établissement d'interactions dont les forces électrostatiques entre NPs et lipides membranaires. De plus, l'accroissement de la mobilité des molécules de DPPC à 37°C, température proche de la T_m du DPPC, avantagerait les changements de conformation des lipides (redressement de la tête polaire par exemple), et l'abaissement de la température à 21°C figerait ainsi cet état. Cependant, nous pouvons remarquer qu'aucun épaississement n'est observé au sein de la phase fluide. Ceci est peut être dû à la forte mobilité des molécules de DOPC quelle que soit la température (21°C ou 37°C). En effet, les expérimentations de fluorescence (utilisant le Laurdan et le Prodan) ont montré que la phase fluide était plus affectée par le gain d'ordre, donc les lipides en phase fluide, dont le DOPC fait partie, interagissent également avec les NPs de TiO₂. Néanmoins, les molécules étant extrêmement mobiles, l'épaississement de la phase fluide ne peut être visible car il n'est pas figé.

Le temps d'exposition avec les NPs ainsi que la température d'incubation sont donc des paramètres qui peuvent influencer le degré de perturbation des lipides constituant les vésicules du surfactant pulmonaire.

Ces résultats observés par AFM sont corroborés avec les expérimentations précédentes de Laurdan/Prodan. En effet, l'incubation de liposomes avec des NPs de TiO₂, chargées négativement à pH 7,4, a révélé une augmentation de l'ordre significative au niveau de la tête polaire des lipides. Cet accroissement de l'ordre membranaire serait ainsi dû au redressement des têtes polaires des lipides comme l'ont suggéré Granick et ses collaborateurs (Wang et al, 2008). Il semblerait donc que cette hypothèse soit vérifiée avec les images AFM qui montrent clairement un épaissement de la phase gel probablement dû à ce redressement de la partie hydrophile des lipides.

L'inhalation de NPs de TiO₂, nous l'avons vu, les conduit en premier lieu au contact du surfactant pulmonaire mais leur diffusion ainsi que leur propagation au sein de l'organisme impliquent leur interaction avec d'autres barrières biologiques telles que les membranes cellulaires. De plus, d'autres voies peuvent être touchées par l'exposition aux NPs de TiO₂. En effet, leur utilisation dans de nombreux produits de la consommation courante amène à considérer leur entrée par les voies digestive et cutanée (Stern & McNeil, 2008). De plus, des études ont montré l'interaction directe entre les membranes plasmiques et des NPs de TiO₂ (Allouni et al, 2012; Thevenot et al, 2008), qui pourraient alors perturber le rôle de barrière ou bien de plateforme de signalisation des membranes cellulaires. La nature des constituants lipidiques entre les vésicules du surfactant pulmonaire et les membranes cellulaires étant très différentes, nous nous sommes proposés de réaliser une étude parallèle avec des modèles biomimétiques de membranes cellulaires. Nous nous sommes intéressés tout d'abord à un modèle binaire simple de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire) avant de complexifier la composition avec des mélanges ternaires contenant du cholestérol. Des membranes de DOPC/SM/Chol 4:3:1 et 2:1:1 (ratio molaire) ont été utilisées comme modèle pour mimer les membranes cellulaires et les rafts lipidiques de celles-ci (voir dans la partie bibliographique, I.5. Les rafts lipidiques) respectivement.

III.2. Interaction des NPs de TiO₂ avec des modèles lipidiques des membranes cellulaires

III.2.1. Adsorption des liposomes à la surface des NPs de TiO₂

Afin d'évaluer l'interaction entre les NPs de TiO₂ et des vésicules lipidiques biomimétiques des membranes cellulaires, nous nous sommes proposés de quantifier l'adsorption de ces liposomes sur les NPs de TiO₂. Pour cela, les NPs d'anatase à différentes concentrations (de 0 à 2000 µg/mL) sont incubées 30 minutes avec des LUVs à 10 µM de DOPC/SM 1:1, de DOPC/SM/Chol 4:3:1 et 2:1:1 (ratio molaire). Dans ces liposomes est encapsulée une sonde fluorescente, la calcéïne, qui nous permettra de quantifier le taux de vésicules adsorbées aux NPs. Après centrifugation, le surnageant est prélevé et la fluorescence est mesurée, après ajout de Triton X-100 (TX-100). Ainsi, la différence d'intensité de fluorescence entre les échantillons avec et sans NPs est calculée, et le pourcentage de liposomes adsorbés avec les NPs culottées peut être déterminé.

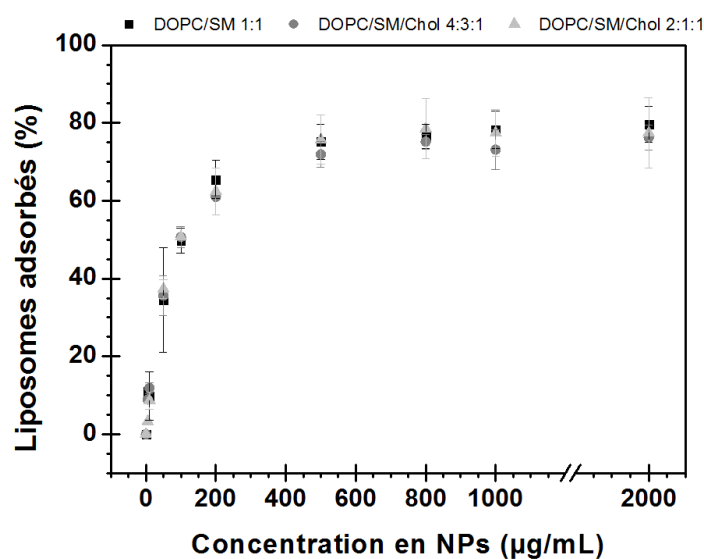


Figure 83. Adsorption des liposomes sur les NPs de TiO₂ après centrifugation

Les liposomes à 10µM, de différentes compositions, contenant la calcéïne et les NPs, à différentes concentrations, sont incubés avant d'être centrifugés. Le surnageant est prélevé et l'intensité de fluorescence des liposomes restant en suspension est mesurée. Les expérimentations ont été réalisées en triplicata ; chaque point représente la moyenne de ces 3 expériences indépendantes. Les compositions lipidiques sont indiquées en ratio molaire.

Sur la Figure 83, nous pouvons observer que le pourcentage de liposomes adsorbés augmente avec la concentration en NPs de TiO₂ jusqu'à atteindre 75-80 % à partir d'une concentration de NPs à 500 µg/mL quel que soit le taux de cholestérol dans les vésicules lipidiques. Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus avec l'expérience réalisée avec un mélange de DOPC/DPPE 1:1 (présenté dans la Figure 74), nous pouvons noter que les NPs de TiO₂ parviennent à retenir 30 % de liposomes supplémentaires lorsque ceux-ci contiennent de la SM (~ 80 % pour les vésicules avec de la SM et ~ 50 % pour la composition DOPC/DPPE). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la SM, par l'intermédiaire de son groupement amine, donneur d'hydrogène (Talbot et al, 2000), serait capable d'établir des liaisons hydrogènes avec les NPs, qui présentent à leur surface des sites hydroxyles déprotonés à pH 7,4. Il apparaît clairement, au vu des résultats, que les NPs interagissent préférentiellement avec les membranes contenant de la SM par l'intermédiaire de différentes interactions électrostatiques, hydrogènes, et pourraient alors perturber davantage les membranes cellulaires. Nous avons donc suggéré d'évaluer, par la suite, les effets potentiels sur la perméabilité membranaire et sur l'état physique de ces membranes, induits par ces NPs de TiO₂.

III.2.2. Influence des NPs de TiO₂ sur l'intégrité membranaire

III.2.2.1. Influence des NPs de TiO₂ sur la perméabilité membranaire

Dans un premier temps, nous avons donc mesuré la capacité des NPs d'anatase à perméabiliser les membranes cellulaires. Pour cela, nous avons encapsulé la calcéine dans des LUVs de DOPC/SM 1:1, de DOPC/SM/Chol 4:3:1 et 2:1:1 (ratio molaire) que nous avons incubé 30 minutes avec des NPs à différentes concentrations. La fluorescence est ensuite mesurée, comme dans la partie précédente, puis comparée avec la fluorescence obtenue après lyse totale des liposomes, après ajout du TX-100.

Sur la Figure 84, représentant le pourcentage de calcéine libérée après exposition aux NPs, nous pouvons remarquer une faible libération de calcéine de l'ordre de 14 ± 7 , 12 ± 6 et 9 ± 7 % pour les LUVs de DOPC/SM 1:1, DOPC/SM/Chol 4:3:1 et 2:1:1 (ratio molaire), respectivement, en présence de 200 µg/mL de NPs. Compte-tenu de l'importance des écarts-types, nous ne pouvons pas statuer sur la capacité lytique des NPs.

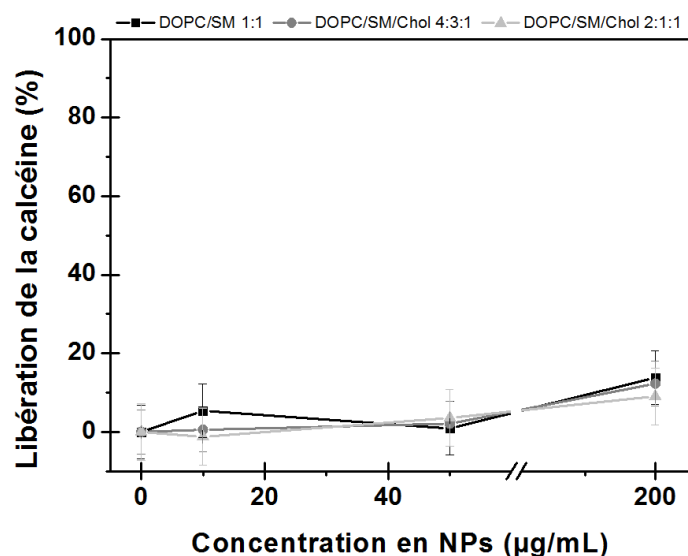


Figure 84. Mesure de la perméabilité membranaire en présence de NPs de TiO₂

La calcéine est encapsulée dans des LUVs, de différentes compositions, à la concentration finale de 10 µM. La fluorescence est mesurée après 30 minutes d'incubation avec les NPs de TiO₂ puis divisée par la fluorescence émise après lyse totale des vésicules, après ajout du TX-100. Les expérimentations ont été réalisées en triplicata ; chaque point représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les compositions lipidiques sont indiquées en ratio molaire.

Bien que le rôle des NPs de TiO₂ sur la perméabilisation membranaire, dans nos conditions, n'ait pu être prouvé, d'autres travaux ont démontré un effet lytique des NPs de TiO₂ avec des temps d'incubation plus longs (Jeng & Swanson, 2006). De ce fait, l'interaction préférentielle des NPs d'anatase avec la SM, constituant les membranes plasmique des cellules, ne fait aucun doute.

III.2.2.2. Influence des NPs de TiO₂ sur la fluidité membranaire

Les mesures de variations de fluidité membranaire, réalisées précédemment, avec une composition de DOPC/DPPC, ont montré l'impact des interactions entre NPs et membrane sur la baisse de fluidité des lipides aux niveaux de leurs têtes polaires. Ainsi, nous nous sommes proposés d'évaluer l'influence des NPs de TiO₂ sur l'état physique des membranes cellulaires. Les sondes de Laurdan et de Prodan (Parasassi & Gratton, 1995) ; (Weber & Farris, 1979) ont également été utilisées pour mesurer l'état de fluidité/compaction de la membrane lipidique au niveau des parties hydrophobes et hydrophiles respectivement. Les mesures des GPs des deux molécules fluorescentes ont été réalisées à différentes températures de 10 à 70°C sur des liposomes de différentes compositions contenant de la SM et/ou du Chol, en présence de différentes concentrations de NPs d'anatase.

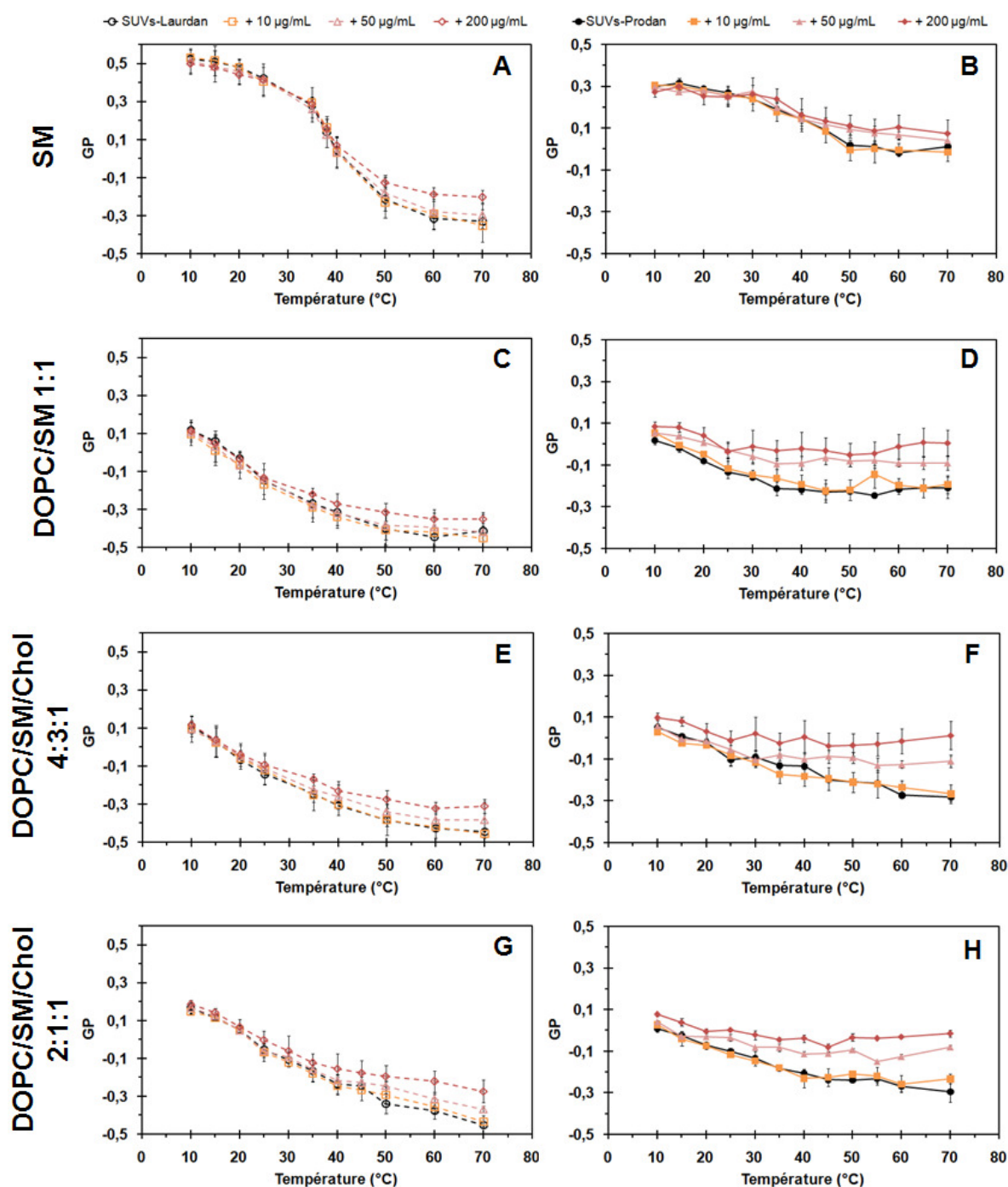


Figure 85. Mesure de la variation du GP des sondes Laurdan et Prodan sous l'influence des NPs de TiO₂
 Quatre compositions lipidiques contenant de la SM ont été testées : SM pure (A et B), un mélange binaire de DOPC/SM (C et D), et enfin deux mélanges ternaires de DOPC/SM/Chol à différents ratios (E à H). Pour chaque composition, la variation des GPs des sondes fluorescentes de Laurdan (A, C, E et G), caractérisée par les courbes en pointillés, et de Prodan (B, D, F, H), définie par les courbes pleines, est mesurée. L'effet de la concentration en NPs a également été évalué en réalisant les expérimentations en présence de NPs d'anatase de 0 à 200 μg/mL. Les expérimentations ont été réalisées en triplicata ; chaque point représente la moyenne de ces 3 expériences indépendantes. Les compositions lipidiques sont indiquées en ratio molaire.

Comme présentée précédemment, dans la partie III.2.1.2, la Figure 85 représente les mesures des GPs des deux sondes dans différents environnements lipidiques contenant de la SM avec ou sans Chol. En ce qui concerne la composition de SM pure, nous pouvons remarquer, sur la Figure 85 A et B, que les NPs de TiO₂ n'influencent pas la température de transition de phase du lipide, restant constante à 39°C (Arnulphi et al, 2007) et ce quelle que soit la concentration en NPs. De manière globale, nous pouvons constater un effet de la température accompagné d'un effet modéré de la concentration en NPs, pour les quatre compositions lipidiques, aussi bien pour le GP_L que pour le GP_P. En effet, sur les huit graphiques, nous pouvons observer que l'augmentation de la température accentue légèrement les écarts entre les GPs mesurés en absence et en présence de NPs, traduisant une augmentation d'ordre au niveau des têtes polaires (augmentation du GP_P) ainsi que des chaînes aliphatiques (accroissement du GP_L) des lipides. Ainsi, pour la SM, l'augmentation d'ordre au niveau des chaînes aliphatiques est significative à partir de 40°C et pour les mélanges binaires et ternaires à partir de 25°C. Ces résultats suggèrent également que la présence de NPs induit un gain d'ordre au niveau des chaînes aliphatiques des lipides lorsque ceux-ci sont en phase fluide. En ce qui concerne les variations de fluorescence de la sonde Prodan, nous pouvons observer, pour les mélanges, que l'augmentation d'ordre au niveau des têtes polaires est significative quelle que soit la température à une concentration de 200 µg/mL, et ce, même si les lipides sont en phase gel, à l'inverse de la sonde Laurdan (Figure 85 D, F et H). Si nous nous intéressons à l'effet de la présence de Chol sur les variations des GPs, nous pouvons noter des profils similaires (Figure 85 C-H) en absence ou en présence de différents taux de Chol.

Curieusement, ces résultats montrent que la fluidité membranaire est plus altérée sur les mimes des vésicules du surfactant pulmonaire (cf. Figure 76) que ceux des membranes cellulaires, alors que les expériences d'adsorption et de perméabilisation de membranes montraient des résultats plus probants pour les compositions constituées de SM. Toutefois, nous pouvons, de la même manière, conclure que l'effet des NPs est également modulé par la température, la composition lipidique, l'état physique initial de la membrane.

Afin de comparer nos résultats plus finement, nous avons déterminé la variation de GP (ΔGP) correspondant à la différence entre le GP mesuré en présence de NPs (à 200µg/mL) et celui mesuré en absence de NPs à 35°C (en se rapprochant de la température physiologique de 37°C). Les résultats sont présentés dans la Figure 86.

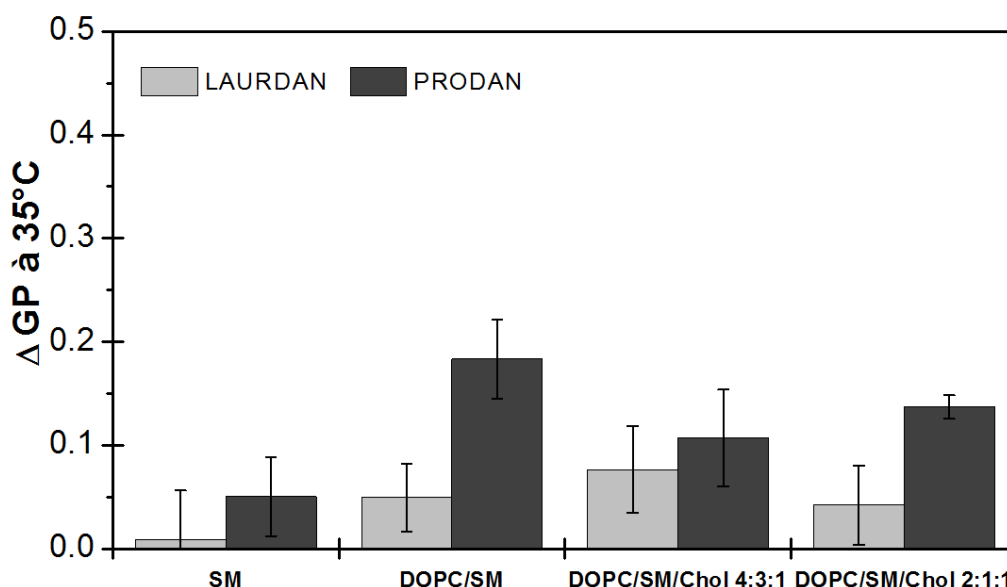


Figure 86. Variation de l'ordre membranaire à 35°C induite par la présence de NPs de TiO₂ à 200µg/mL
Variation du GP_L (en clair) et du GP_P (en foncé) correspondant à la différence entre le GP mesuré en présence de NPs (à 200µg/mL) et celui mesuré en absence de NPs, à une température proche de la température physiologique (37°C). Les compositions lipidiques sont indiquées en ratio molaire.

Grâce à cette représentation secondaire, nous pouvons observer que les variations de GP sont, pour ces 4 compositions, plutôt faibles (au maximum, le ΔGP_P pour le DOPC/SM est de 0,2). Globalement, comme pour les compositions mimant les vésicules du surfactant pulmonaire, les variations de GP_P sont plus accentuées que les variations de GP_L. Ainsi, les NPs interagiraient préférentiellement avec les têtes polaires des lipides membranaires.

Les expérimentations précédentes ont montré clairement une interaction entre les NPs de TiO₂ et les lipides membranaires des cellules eucaryotes : adsorption des SUVs avec des agglomérats/ agrégats de NPs jusqu'à 80 %, perturbation modérée de la fluidité, et une perméabilisation membranaire probable. Tout comme précédemment, nous nous sommes proposés de visualiser les effets induits par les NPs sur des SLBs de différentes compositions contenant de la SM mimant les membranes cellulaires, par AFM.

III.2.3. Visualisation des changements morphologiques de bicouches lipidiques après exposition aux NPs

Dans cette partie, les SLBs sont préparées par fusion de liposomes de différentes compositions. Les échantillons sont ensuite incubés avec des NPs de TiO₂ de 1 à 200 µg/mL pendant 30 minutes avant d'être rincés afin de pouvoir être imagés.

III.2.3.1. Effet de la concentration en NPs

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de la concentration en NPs d'anatase sur une composition binaire de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire), en incubant les SLBs avec une concentration croissante en NPs de 5 à 200 µg/mL pendant 30 minutes avant de rincer les échantillons avec du tampon TBS afin d'enlever tous résidus de NPs pour pouvoir imager les bicouches planes correctement. Sur la Figure 87, nous pouvons observer qu'après 30 minutes d'incubation avec les NPs à 5 µg/mL, la différence de hauteur entre phase gel, enrichie en SM et phase fluide, enrichie en DOPC est préservée. En effet, les domaines de SM sont surélevés de $1,0 \pm 0,1$ nm, conformément à la littérature (El Kirat & Morandat, 2007) par rapport au DOPC avant l'addition des NPs et celle-ci demeure inchangée après incubation et rinçage. Cependant nous pouvons observer une nette redistribution des lipides que ce soit au niveau du gros domaine principal enrichi en SM ou des plus petits dispersés dans la phase fluide (Figure 87 A et B). Lorsqu'on augmente la concentration des NPs à 10 µg/mL, nous pouvons constater non seulement une redistribution des lipides mais aussi l'apparition d'un troisième niveau de gris au niveau des pourtours des domaines enrichis en SM. L'augmentation de la concentration en NPs montre que l'épaississement de la phase gel des domaines est progressif : d'abord le contour du domaine (à 10 µg/mL) puis l'intégralité de ceux-ci à une concentration en NPs de 200 µg/mL. Le fait que l'épaississement ait lieu d'abord à la périphérie des domaines enrichis en SM pourrait s'expliquer par la présence de molécules de DOPC dans cette zone. En effet, cette présence empêcherait la formation de liaisons H entre les SM, contribuant à la stabilisation du domaine. Ainsi, les zones les moins stables, aux bords, seraient préférentiellement « touchées » par les NPs de TiO₂. A l'inverse, le centre du domaine, renforcé par les liaisons H établies entre les molécules de SM, serait moins sensible à l'exposition des NPs. Cependant nous pouvons noter qu'à partir de 50 µg/mL, la quasi-totalité du domaine est concernée par l'épaississement.

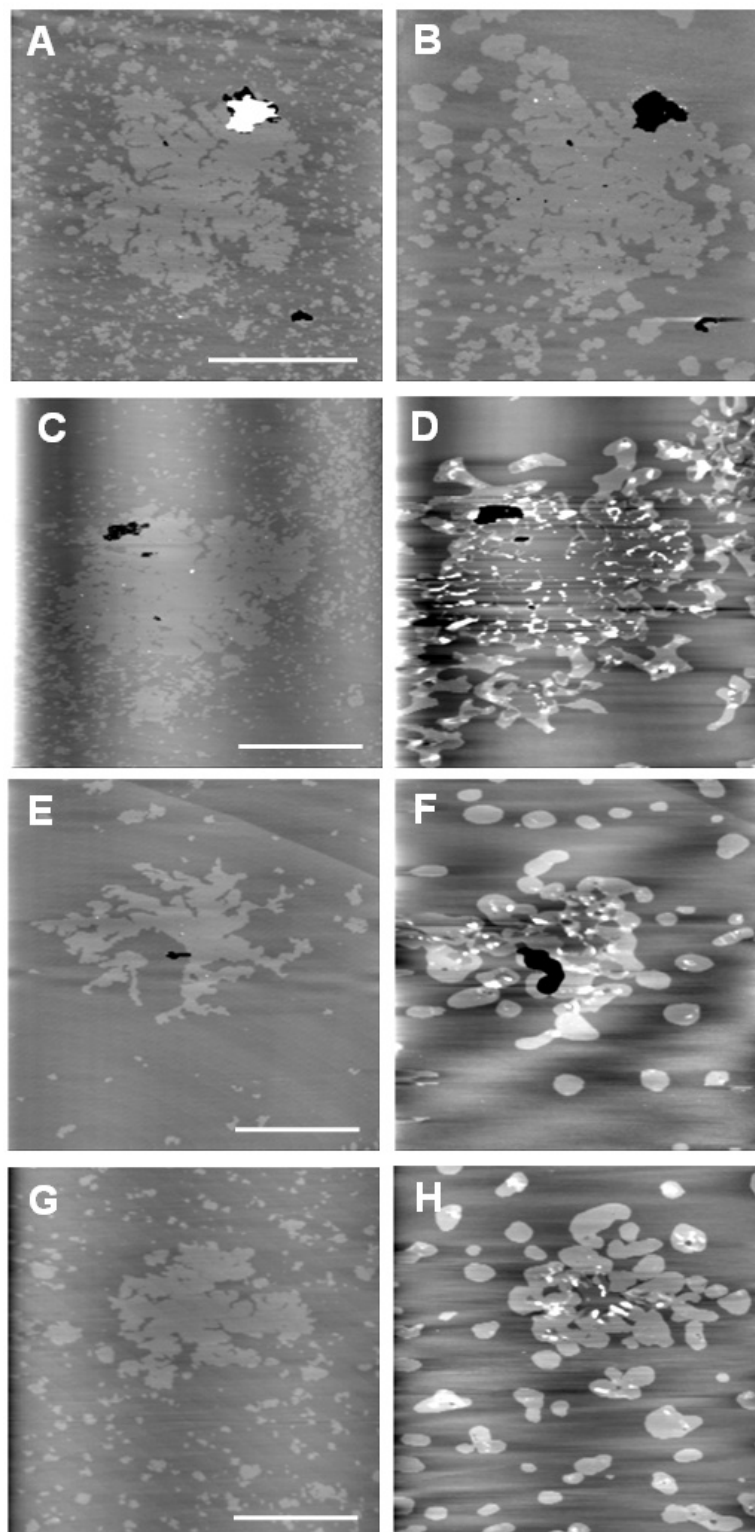


Figure 87. Images AFM de bicouches de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO₂ à 21°C.

Les bicouches de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire) sont imagées avant (A, C, E et G) et après incubation (B, D, F et H) pendant 30 minutes avec des NPs d'anatase à 5 µg/mL (B), 10 µg/mL (D), 50 µg/mL (F) et 200 µg/mL (H). Après incubation, les bicouches sont rincées 3 fois avec du tampon TBS pour enlever les NPs et pouvoir imager les SLBs. Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 10 µm, échelle en z = 10 nm.

Afin de quantifier l'épaississement de la phase gel provoqué par l'exposition aux NPs, un trait de section réalisé sur un grossissement de l'image D de la Figure 87 est présenté ci-dessous :

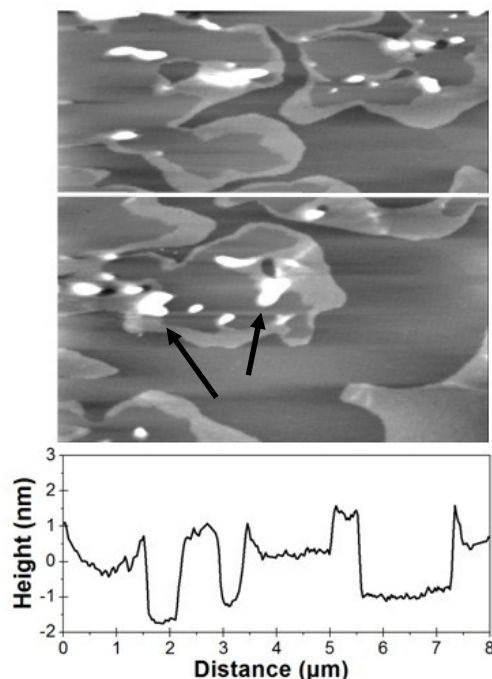


Figure 88. Grossissement de l'épaississement observé sur un domaine de SM après incubation avec des NPs de TiO₂ à 10 µg/mL pendant 30 min.

L'épaississement observé en Figure 87, après incubation pendant 30 min avec suspension de NPs de TiO₂ à 10 µg/mL, est quantifié grâce au trait de section réalisé sur l'image de hauteur ci-contre. Ainsi, les zones épaissies sont surélevées en moyenne de l'ordre de 2 nm par rapport au DOPC. Les flèches pleines indiquent les structures adsorbées à la surface de la bicouche. Barre d'échelle = 1 µm et échelle en z = 10 nm.

Sur l'image de hauteur, nous pouvons visualiser nettement l'épaississement du domaine de SM exclusivement sur les bords sur 100-500 nm. Le trait de section réalisé sur cette image révèle une différence de hauteur, entre la zone du domaine surélevé et le DOPC, de l'ordre de $(2,0 \pm 0,3)$ nm. De plus, nous pouvons noter que la différence de hauteur entre la phase gel, enrichie en SM (non épaissie), et la phase fluide demeure inchangée : $(1,0 \pm 0,1)$ nm.

Nous pouvons également détecter la présence de nombreuses structures déposées à la surface de la membrane (Figure 88, flèches pleines). La nature de ces structures pourrait être des NPs (sous forme dissociées) de TiO₂ adsorbées à la surface ou bien des vésicules lipidiques, provenant de la SLB. Egalement adsorbées à la surface, elles pourraient être formées par « détachement de la membrane » sous l'effet des NPs ou encore des rinçages consécutifs. Cette dernière hypothèse est moins probable car nous n'observons pas de trous au sein de la

SLB pouvant indiquer une désorption localisée de phospholipides. De plus, afin de vérifier l'effet de l'étape de rinçage sur la perturbation de la SLB, nous avons imagé une bicouche de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire) après incubation pendant 30 minutes avec une suspension de NPs à 10 µg/mL sans avoir été préalablement rincée. La concentration de NPs choisie pour cette expérimentation étant relativement faible, nous n'avons pas rencontré de problème de diffraction/perturbation du laser du microscope pour l'imagerie de la bicouche dans de telles conditions. L'image de la SLB, acquise après exposition aux NPs, présente les mêmes caractéristiques topographiques qu'une bicouche incubée avec une concentration en NPs de 10 µg/mL, ayant subi les étapes de rinçage (épaississement des bords du domaine enrichi en SM, redistribution des lipides, présence de structures adsorbées à la surface du domaine en phase gel). Curieusement, bien que les NPs de TiO₂ soient bien présentes à la surface de la bicouche lipidique, dans ces conditions (concentration et temps d'incubation permettant une bonne sédimentation des NPs sur l'échantillon), nous n'observons pas plus d'agglomérats à la surface sans l'étape de rinçage. Pourtant, les agrégats/agglomérats de NPs déposés sur la SLB sont clairement visibles au microscope optique. Le fait d'imager les bicouches en mode contact, pourrait expliquer ce phénomène : en scannant l'échantillon à l'aide de ce mode, les agrégats sont déplacés au fur et mesure par la pointe balayant la surface. Cette expérience nous permet non seulement de vérifier que l'étape de rinçage n'est ni à l'origine de la redistribution lipidique ni de l'épaississement observé.

Par ailleurs, si nous comparons les résultats obtenus avec les deux compositions différentes, l'une mimant les vésicules du surfactant pulmonaire et l'autre les membranes cellulaires, nous remarquons que les membranes de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire) sembleraient être plus sensibles que celles composées de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire). En effet, un épaississement est observé à partir d'une concentration en NPs de 10 µg/mL à température ambiante pendant 30 minutes d'exposition alors qu'un tel effet n'est observé qu'à des temps d'incubation plus longs (2h30) et pour des concentrations 5 fois plus élevées. (50 µg/mL). Cet effet, plus prononcé sur la composition de DOPC/SM, pourrait s'expliquer par le fait que NPs et molécules de SM établiraient des liaisons hydrogènes entre elles, comme suggéré précédemment. Il est donc tout à fait envisageable que le réseau de liaisons hydrogènes SM-SM soit rompu au profit de la formation de liaisons hydrogènes avec les NPs d'anatase. A l'inverse, les molécules de DPPC, ne possédant de groupement donneur d'hydrogène ne peuvent établir de telles interactions avec les NPs.

Bien que les résultats précédents montrent clairement une interaction privilégiée entre les molécules de SM, composant les membranes cellulaires, et les NPs de TiO₂, celles-ci demeurent plus complexes et un autre constituant majeur doit être pris en compte dans la composition des modèles : le cholestérol. En effet, nous l'avons vu dans la partie bibliographique, ce stérol présent dans les membranes biologiques est impliqué dans de nombreux processus cellulaires et notamment dans la formation des rafts lipidiques. Ainsi, nous avons choisi de visualiser par AFM, l'effet de ces NPs sur des compositions ternaires de DOPC/SM/Chol 4:3:1 et 2:1:1 correspondant respectivement aux mimes de membranes cellulaires et de rafts lipidiques (El Kirat & Morandat, 2007).

III.2.3.2. Effet du cholestérol

Dans un premier temps, des SLBs de DOPC/SM/Chol 4:3:1 (ratio molaire) sont incubées avec une concentration croissante en NPs de 1 à 10 µg/mL pendant 30 minutes avant d'être rincées. Sur la Figure 89, nous pouvons observer, après 30 minutes d'incubation avec les NPs à 1 µg/mL, une redistribution nette des lipides mais également un épaissement généralisé de la phase gel enrichie en SM et Chol. En effet, avant injection, les domaines présentent une différence de hauteur de l'ordre de $(0,8 \pm 0,1)$ nm, conformément à la littérature (El Kirat & Morandat, 2007) par rapport au DOPC (Figure 89 A) et après incubation avec les NPs de TiO₂, ceux-ci sont surélevés d'environ $(2,0 \pm 0,3)$ nm (Figure 89 B). L'exposition aux NPs, provoque également une interconnexion des domaines en phase gel, favorisée par une mobilité membranaire accentuée par la présence de Chol. A des concentrations en NPs supérieures, l'effet observé est similaire, l'intégralité des domaines est épaissie, le remaniement de ceux-ci est beaucoup plus accentué, aucun repère ne peut être pris en compte pour retrouver la zone avant injection, les changements morphologiques de la membrane étant si importants.

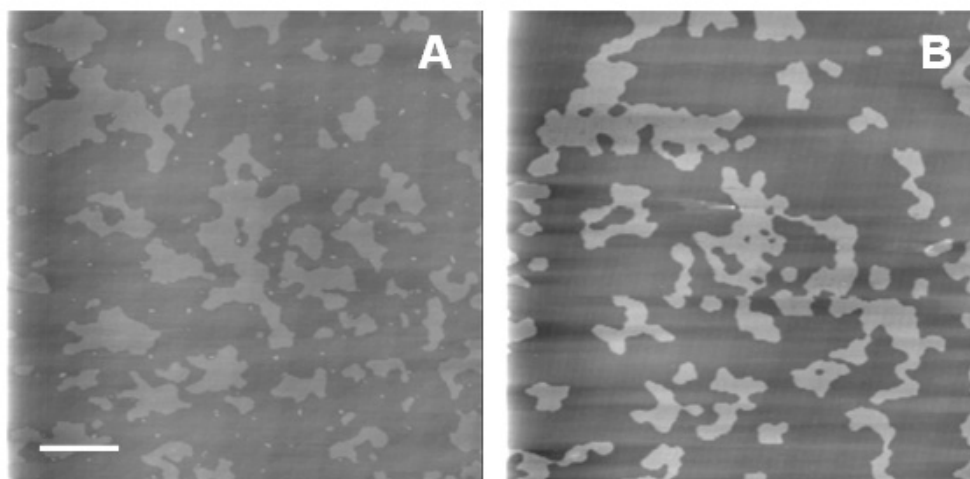


Figure 89. Images AFM de bicouches de DOPC/SM/Chol 4:3:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO₂ à 21°C.

Les bicouches de DOPC/SM/Chol 4:3:1 (ratio molaire) sont imagées avant (A) et après incubation (B) pendant 30 minutes avec des NPs d'anatase à 1 µg/mL. Après incubation, les bicouches sont rincées 3 fois avec du tampon TBS pour enlever les NPs et pouvoir imagier les SLBs. Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 10 µm, échelle en z = 10 nm.-

Dans un second temps, des SLBs de DOPC/SM/Chol 2:1:1 (ratio molaire), mimant les rafts lipidiques des membranes cellulaires, sont incubées avec une concentration croissante en NPs de 1 à 10 µg/mL pendant 30 minutes avant d'être rincées. Sur la Figure 90, nous pouvons observer qu'après 30 minutes d'incubation avec les NPs à 1 µg/mL, la différence de hauteur entre la phase Lo, enrichie en SM et Chol, et la phase fluide, est globalement préservée. Nous pouvons remarquer quelques zones épaissies de très petites tailles, inférieures à 100 nm, que nous caractériserons plus tard. Les domaines de SM sont surélevés de $0,8 \pm 0,1$ nm, conformément à la littérature (El Kirat & Morandat, 2007) par rapport au DOPC aussi bien avant qu'après l'addition des NPs de TiO₂. Néanmoins, nous pouvons observer une nette redistribution des lipides que ce soit au niveau des gros domaines ou des plus petits dispersés dans la phase fluide (Figure 90 A et B). Lorsqu'on augmente la concentration des NPs à 5 µg/mL, nous pouvons constater un remaniement profond de la ségrégation de phase mais également la formation d'un troisième niveau de gris au niveau du centre des domaines en phase Lo, enrichis en SM et Chol. A partir d'une concentration de 10 µg/mL en NPs, c'est l'intégralité de la phase Lo qui est concernée par l'épaississement avec une redistribution des lipides telle, que la zone imagée avant incubation n'est plus repérable par aucun élément : tous les domaines sont regroupés en formant un seul et unique « bloc » épaissi (Figure 90 F).

RESULTATS

Chapitre III. Interaction des NPs de TiO₂ avec des modèles membranaires biomimétiques

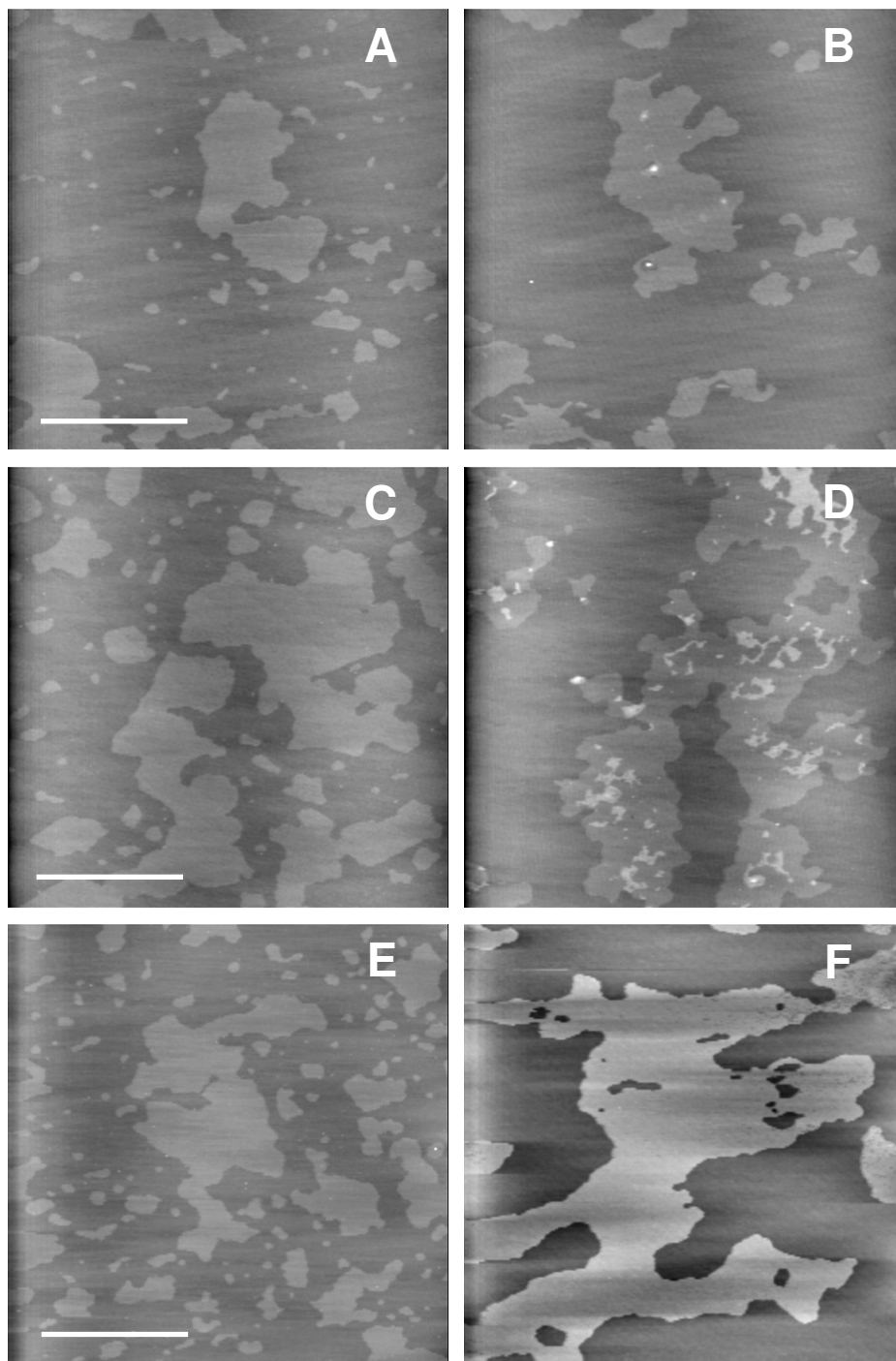


Figure 90. Images AFM de bicouches de DOPC/SM/Chol 2:1:1 (ratio molaire) avant et après incubation pendant 30 min avec des NPs de TiO₂ à 21°C.

Les bicouches de DOPC/SM/Chol 2:1:1 (ratio molaire) sont imagées avant (A, C, et E) et après incubation (B, D et F) pendant 30 minutes avec des NPs d'anatase à 1 µg/mL (B), 5 µg/mL (D) et 10 µg/mL (F). Après incubation, les bicouches sont rincées 3 fois avec du tampon TBS pour enlever les NPs et pouvoir imager les SLBs. Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations distinctes. Barre d'échelle = 10 µm, échelle en z = 10 nm.

Dans un second temps, nous avons voulu quantifier les différences de hauteur comme effectué avec les compositions précédentes. Sur l'image de hauteur de la Figure 91, nous pouvons observer au sein du domaine en phase Lo, une structure sphérique entourée d'un liseré correspondant à un niveau de hauteur intermédiaire. Afin de caractériser la nature de ces épaissements nous avons réalisé un trait de section pour mesurer les différences de hauteur.

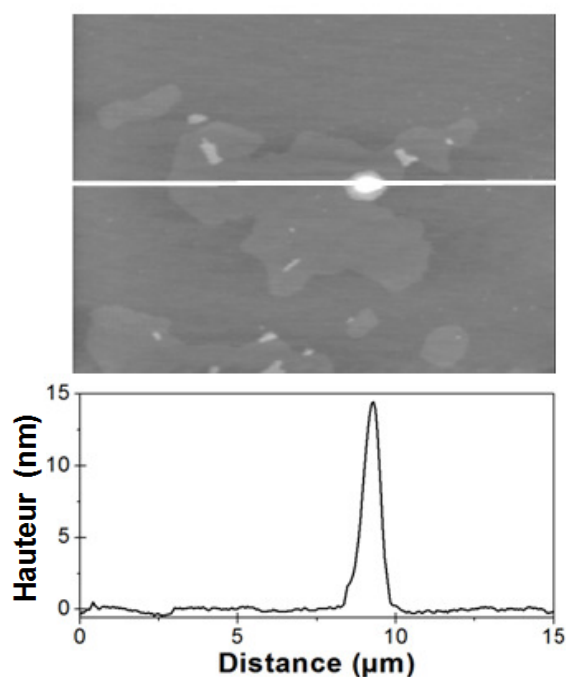


Figure 91. Grossissements d'un domaine en phase Lo après incubation avec des NPs de TiO_2 à $1 \mu\text{g/mL}$ pendant 30 min.

Les structures observées en Figure 90, après incubation pendant 30 min avec suspension de NPs de TiO_2 à $1 \mu\text{g/mL}$, sont caractérisées grâce au trait de section réalisé sur l'image de hauteur ci-contre. D'après les différences de hauteurs, la structure sphérique pourrait être très probablement une NP (différence de hauteur de l'ordre de 15 nm par rapport à la DOPC) enfouie dans la membrane provoquant tout autour d'elle un épaissement de la phase Lo de l'ordre de 0,9 à 1,0 nm par rapport à la normale. Image de $10 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$; échelle en $z = 10 \text{ nm}$.

D'après les différences de hauteur mesurées entre la structure sphérique et la phase fluide de DOPC de l'ordre de 15 nm, et au vu du liseré épaissi de 1,7 nm par rapport au DOPC, nous pouvons supposer que cette structure sphérique pourrait être très probablement une NP enfouie, ou tout du moins adsorbée, à la membrane. Il s'agirait donc d'une NP isolée (la taille des NPs est défini par le fournisseur inférieure à 25 nm), les agrégats/agglomérats étant enlevés par l'étape de rinçage et/ou déplacé par la pointe lors de l'acquisition de l'image.

La présence de cholestérol dans la membrane, nous l'avons vu à travers les images AFM réalisées, accentue considérablement les effets des NPs de TiO₂ ; ces dernières perturbent considérablement la morphologie de la bicouche même à de très faibles concentrations. En effet, pour visualiser un épaissement des domaines lipidiques au sein d'une SLB de DOPC/SM sans cholestérol, une suspension de NPs à 10 µg/mL est nécessaire alors qu'une concentration 10 fois moins importante est suffisante pour observer un effet plus prononcé sur les compositions ternaires (en particulier pour la composition de DOPC/SM/Chol 4:3:1 (ratio molaire)). Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons supposer que, le cholestérol, présent au sein des domaines enrichis en SM, s'intercale entre ces molécules diminuant ainsi les interactions entre elles. Ce réseau de liaisons hydrogènes étant plus restreint, les molécules de SM seraient plus facilement impliquées dans l'interaction avec les NPs de TiO₂.

L'épaississement de la totalité des domaines enrichis en SM et Chol (qu'ils soient en phase L_β ou L_o) provoque une plus grande exposition de la zone hydrophobe au niveau de la ligne de tension des domaines. Ces interactions étant très défavorables, et les lipides étant plus mobiles grâce à la présence de cholestérol, les domaines seraient alors « remaniés » de façon à diminuer cette ligne de tension. De cette manière ces interactions défavorables entre chaînes aliphatiques et molécules d'eau du milieu seraient diminuées.

III.3. Conclusions

La perturbation des membranes biologiques causée par l'exposition aux NPs en suspension, est manifeste. En effet, grâce aux images AFM et aux techniques complémentaires nous avons pu prouver que les NPs induisent des remaniements membranaires (plus ou moins accentués selon la composition lipidique) aussi bien latérales (redistribution lipidique) que topographiques (épaississement au niveau des domaines membranaires). Après avoir caractérisé ces NPs en suspension (taille, charge), nous avons, dans un premier temps, évalué la capacité des NPs à perméabiliser les membranes de différentes compositions. Bien que les données bibliographiques divergent sur ce point, tous les auteurs sont d'accord pour signaler que les effets mesurés dépendent des propriétés physico-chimiques des NPs (Park et al, 2007) utilisées ainsi que de la nature de la cible (Barillet et al, 2010). Ainsi, des études ont montré un effet lytique des membranes cellulaires (Park et al, 2007) alors que d'autres plus nuancées, ont suggéré les NPs de TiO₂ pouvaient interagir avec la membrane sans provoquer sa rupture

et être internalisées dans les cellules (Allouni et al, 2012; Choi et al, 2010). Ainsi, d'après les expériences de libération de calcéine, nous pouvons en déduire que les NPs de TiO₂ d'anatase (caractérisées par une taille de l'ordre de 500 nm, et un potentiel-zéta de -2 mV, suspendues dans un tampon TBS à pH 7,4) ne perméabilisent pas les membranes lipidiques mimant les vésicules du surfactant pulmonaire (mélange équimolaire de DOPC/DPPC) ou mimant les membranes cellulaires (contenant de la SM avec ou sans Chol).

Grâce à des expérimentations complémentaires, utilisant les mesures de libération de calcéine, nous avons pu mettre en évidence d'une adsorption des liposomes à la surface des NPs de TiO₂ significative de l'ordre de 50 % pour le mélange de DOPC/DPPC et jusqu'à 85 % pour les compositions contenant de la SM. Ainsi nous avons entrepris d'évaluer les perturbations membranaires, aussi bien au niveau des chaînes aliphatiques que des têtes polaires, induites par l'adsorption/interaction avec des NPs d'anatase. Grâce aux deux sondes fluorescentes utilisées, incorporées dans les vésicules lipidiques, nous avons pu montrer clairement que les NPs interagissent préférentiellement avec les têtes polaires en augmentant l'ordre membranaire. Grâce aux données bibliographiques, nous avons conclu que les NPs, chargées négativement, établiraient des interactions électrostatiques avec les groupements de choline, lui chargé +, ce qui entrainerait un redressement local des têtes polaires (Wang et al, 2008). Les résultats de fluorescence des membranes contenant de la SM et/ou du Chol montrent que les NPs influencent moins l'ordre membranaire probablement dû à une plus grande stabilité de ces membranes, favorisée par l'établissement de liaisons H.

Grâce à l'imagerie AFM, des effets induits par l'interaction entre NPs de TiO₂ et membranes lipidiques, nous avons pu visualiser un remaniement des domaines aussi bien en phase L_β que Lo, un épaissement localisé ou bien généralisé à certaines concentrations. Nous avons pu démontrer que ces effets dépendaient fortement de la nature des phospholipides, du temps d'exposition ainsi que de la température d'incubation. En effet, les NPs interagissent fortement avec les membranes contenant du cholestérol et de la SM et beaucoup moins avec le DPPC. Ceci pourrait s'expliquer par l'établissement d'interactions plus fortes entre les NPs et les SM (par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes), qui seraient favorisées en présence de Chol. Ces résultats ont été confirmés par les expériences d'adsorption des LUVs sur les NPs. Ces interactions, de différentes natures, provoqueraient ainsi le redressement des têtes polaires comme le montrent nos images AFM (épaissement des domaines), nos résultats de

RESULTATS

Chapitre III. Interaction des NPs de TiO₂ avec des modèles membranaires biomimétiques

fluorescence (grâce aux sondes Laurdan et Prodan) et les données bibliographiques (Wang et al, 2008). Tous ces résultats suggèrent donc une interaction particulière des NPs d'anatase avec la SM dont le mécanisme d'interaction mettrait en jeu des liaisons hydrogènes, que les glycérophospholipides ne peuvent pas former.

Discussion

Chapitre I. Contrôle de la structure membranaire et création de membranes à façon

Dans le premier chapitre, nous avons caractérisé des modèles membranaires supportés, utilisés pour les études en AFM. Pour cela, nous avons réalisé des mélanges binaires, avec un phospholipide saturé, le DPPC ou le DSPC, et un phospholipide portant deux insaturations, le DOPC. Ainsi, nous avons pu générer une ségrégation de phase à température ambiante. Les molécules de DPPC ou de DSPC, se trouvant en phase gel à 21°C, s'organisent en domaines. Autour de ces domaines se retrouve une phase fluide enrichie en DOPC. Ainsi, en modulant certains paramètres physico-chimiques nous avons pu visualiser les changements morphologiques (arrangements lipidiques), de ces bicouches mixtes formées.

Dans la première partie, nous avons pu identifier que la température de fusion, l'étape de refroidissement des SLBs, ainsi que la nature des lipides utilisés, influençaient les caractéristiques topographiques des SLBs. Lors de travaux complémentaires, il serait intéressant de mesurer si les différences de morphologie entre les domaines préparés à différentes températures pourraient influencer sur les propriétés mécaniques des SLBs. Par exemple, sur une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire), nous pouvons considérer que la zone centrale d'un domaine est plus riche en DPPC que sur les bords de celui-ci. De ce fait, il pourrait y avoir des différences de propriétés mécaniques entre le centre et la périphérie d'un même domaine (Nussio et al, 2009). Nous pourrions faire le parallèle avec les petits et les gros domaines formés par modulation de la température de fusion.

Aussi, comme évoqué précédemment, des travaux de Seeger (Seeger et al, 2010) ont montré l'influence du support utilisé pour la fusion des SLBs sur la T_m des lipides utilisés. Ainsi, il serait intéressant de vérifier les modulations de tailles et de formes des domaines lipidiques que pourraient provoquer le changement de nature du support.

De plus, les membranes biologiques, nous l'avons vu, sont des structures très complexes. Ainsi, il serait judicieux d'étudier les modulations de tailles et de formes, de compositions lipidiques biomimétiques, plus adaptées, se rapprochant de celles des membranes biologiques. En effet, l'incorporation de cholestérol, par exemple, dans la composition des bicouches

pourrait influencer la taille, la forme et par conséquent modifier les lignes de tension interfaciales entre phase gel ou Lo/fluide (Milhiet et al, 2001). Aussi, les propriétés mécaniques seraient également modifiées comme l'ont montré l'équipe de Garcia-Manyes (Garcia-Manyes et al, 2010), avec une augmentation de la résistance mécanique des membranes en présence de cholestérol.

Outre le fait de mieux comprendre le comportement de ces assemblages lipidiques, régis par des lois physiques, ces expérimentations nous ont également permis d'établir des protocoles spécifiques pour générer des bicouches très diversifiées en termes de ségrégation de phase de taille, et de contour. En effet, la création de ces « membranes à façon », possédant des caractéristiques particulières, est donc une perspective très intéressante dans l'étude de mécanismes d'action avec des molécules exogènes. Ainsi, à travers les deux études menées dans ces travaux de thèse (mécanisme de détoxification de l'hématine et altérations des membranes au contact de NPs manufacturées), nous avons pu / pourront exploiter les résultats obtenus dans cette première partie de caractérisation des SLBs modèles.

Par exemple, nous avons pu utiliser différents ratios en phospholipides saturés / insaturés pour démontrer un changement d'ordre, une redistribution lipidique induite par une molécule exogène (en l'occurrence dans nos travaux, les NPs de TiO_2). L'utilisation d'un ratio en DPPC de 25 %, où les molécules sont dispersées dans la phase fluide a permis de mettre en évidence que les NPs de TiO_2 pouvaient induire une redistribution des lipides, regroupant les molécules de DPPC isolées afin de former des domaines distincts.

Dans un autre exemple, en modulant la température de fusion, nous pouvons également exploiter les différences de morphologies des SLBs. En effet, la formation de petits / gros domaines modulant ainsi, l'étendue de ces lignes de tension entre phase gel et phase fluide, peut être un critère de choix dans l'étude de molécules hydrophobes par exemple. En effet, les molécules exogènes à caractère hydrophobe iront préférentiellement interagir avec cette ligne de tension (ligne de défaut) où une partie des chaînes aliphatiques des molécules en phase gel est exposée au milieu aqueux. Ainsi, plus le nombre de domaines est important, plus les effets de l'agent exogène étudiés seront flagrants et visibles (Blanchette et al, 2006).

Dans notre étude sur le processus de détoxification de l'hématine, nous avons démontré que l'hématine s'insérait au niveau de cette ligne de tension créée par l'interface fluide / gel. Nos

SLBs fusionnées à 60°C montraient de larges domaines de DPPC. Il aurait été intéressant de réaliser ces même SLBs à une température de fusion de 21°C pour former davantage de ligne de défaut. Néanmoins, au vu de l'ampleur des fibres observées (qui se développent ensuite dans la phase gel et fluide), une multiplication des zones de pénétration de l'hématine aurait pu perturber la croissance des fibres (gênées par d'autres générés juste à coté) pouvant induire une mauvaise interprétation du mécanisme de formation de celles-ci.

Ainsi, devant la diversité des molécules exogènes potentielles pouvant interagir avec des membranes biologiques, il est très intéressant de pouvoir moduler les morphologies des bicouches modèles selon l'agent exogène concerné. En étudiant les variations de comportement (effets observés à l'AFM) en fonction des propriétés topographiques des SLBs, les mécanismes d'action peuvent être affinés et interprétés.

La caractérisation des membranes modèles, utilisées en AFM, a été réalisée en exploitant majoritairement la ségrégation de phase existant entre DOPC/DPPC ou encore DOPC/DSPC. Il est depuis longtemps admis que les phospholipides composant les membranes biologiques sont en phase liquide-ordonnée. Cependant, cette interface fluide/gel caractérisée par l'intermédiaire des modèles peut être extrapolée à d'autres lignes de défauts présentes au sein des membranes biologiques. En effet, la présence de protéines transmembranaires ou encore la formation de rafts lipidiques dynamiques constituent autant de points de défauts pouvant interagir préférentiellement avec des molécules exogènes.

Chapitre II. Rôle des membranes lipidiques dans la détoxification de l'hématine : proposition d'un mécanisme d'action

L'élucidation du processus de détoxification de l'hématine est un enjeu clé pour le développement de nouvelles molécules/cibles antipaludiques. En effet, les thérapies classiques utilisant les amino-4-quinoléines (CQ, amodiaquine) ou encore les arylaminoalcools (quinine, méfloquine), sont de plus en plus inactives et inefficaces face aux résistances développées par de nombreuses espèces de *Plasmodium*. Ces antipaludéens agissent directement dans la vacuole digestive en inhibant la formation de l'Hz, par perturbation de l'équilibre monomère / dimères (Alumasa et al, 2011; Casabianca et al, 2008; Dubar et al, 2011).

L'intervention de protéines (enzymes) ou de lipides dans le mécanisme de formation du cristal d'Hz a longtemps été suggérée sans pour autant avoir été prouvée. La toxicité de l'hématine, libérée par dégradation de l'Hb, est, quant à elle, reconnue pour son activité lytique des érythrocytes depuis plusieurs décennies (Chou & Fitch, 1980). Cependant, très peu d'études se sont intéressées au rôle du pH dans l'activité membranolytique de cette molécule ; l'équipe d'Omodéo-Salè a néanmoins montré l'influence du pH sur la peroxydation des lipides par l'hématine (Omodeo-Salè et al, 2001). Ainsi, nous nous sommes concentrés, dans un premier temps, sur les propriétés interfaciales de l'hématine à différents pH par la technique des monocouches de Langmuir. Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer que l'hématine, à pH neutre, est capable de s'insérer à des pressions de surfaces supérieures à la pression interne des membranes biologiques (~ 32 mN/m). A l'inverse, à pH acide, aucune pénétration de l'hématine n'a été enregistrée quelle que soit la pression de surface. En modulant le pH de 5,2 à 7,4, nous avons pu mesurer une réactivation partielle du pouvoir membranotrope de l'hématine, inhibé à pH acide. Parallèlement, les propriétés interfaciales ont également été évaluées en fonction du taux de polymérisation (conversion de l'hématine en β -hématine). Les résultats ont montré que plus le degré de polymérisation était élevé, plus l'hématine était incapable de s'insérer dans une monocouche lipidique. L'équilibre entre les

formes monomériques et dimériques de l'hématine est donc contrôlé par le pH du milieu, qui est également étroitement lié avec le phénomène de polymérisation de la β -hématine (biocristallisation de l'Hz chez le parasite). Les suivis AFM réalisés à différents pH montrent le rôle déterminant de celui-ci dans la formation de fibres, précurseurs d'Hz. En effet, grâce à la visualisation de l'interaction de l'hématine avec des bicouches lipidiques, nous avons pu constater que la croissance de ces fibres se produisait toujours à partir de l'interface fluide/gel. Nous avons donc suggéré que cette ligne de défaut, constituait donc une zone favorable pour établir le point de nucléation des fibres. Cette zone, où les queues hydrophobes des lipides (à la périphérie des domaines) sont exposés, favoriserait d'une part l'insertion de l'hématine au sein de la membrane et d'autre part sa stabilisation par des liaisons de coordination favorisant la nucléation de ces structures fibreuses. Ainsi, l'ensemble de ces résultats et notamment les suivis AFM, nous ont permis de proposer un modèle interprétant la formation de fibres au sein d'une SLB, selon les formes d'hématine présentes dans le milieu (Figure 92).

L'injection de la solution d'hématine à pH 7,4 (Figure 92 A), provoquerait une insertion massive de la forme monomérique majoritaire notamment au niveau de l'interface fluide/gel. L'empilement de ces molécules conduirait probablement à la formation de dimères d'hématine stables ou dimères H-T, assemblés par une liaison de coordination entre le groupement carboxylique et l'atome de fer (voir les différentes formes d'hématine en solution en Figure 31). Cette dimérisation serait à l'origine de la nucléation de fibres d'hématine qui se développent dans la membrane, à partir d'autres molécules d'hématine qui ont pénétré dans la membrane. C'est d'ailleurs cette pénétration massive qui est probablement à l'origine de l'interdigitation des chaînes aliphatiques des molécules de DPPC observée dans le suivi de la Figure 61.

Dans le second cas, le passage par un pH acide, provoque un basculement de l'équilibre vers la formation de dimères (μ -oxo, π - π et H-T) (Figure 92 B). Ainsi, les formes monomériques d'hématine, présentes en solution, sont en plus faible proportion. La nucléation des fibres prend donc plus de temps, après insertion de l'hématine. Après formation des dimères H-T et élongation de fibres dans la membrane, d'autres fibres plus épaisses apparaissent. Celles-ci de nature différente, seraient formées par les formes dimériques d'hématine, et participeraient à l'élongation extra-membranaire des fibres. En effet, ces dimères, étant incapable de pénétrer

DISCUSSION

Chapitre II. Rôle des membranes lipidiques dans la détoxification de l'hématine : proposition d'un mécanisme d'action

dans la membrane, ne peuvent très probablement pas se développer sur la membrane lipidique mais participent néanmoins à la formation de microcristaux d'hématine.

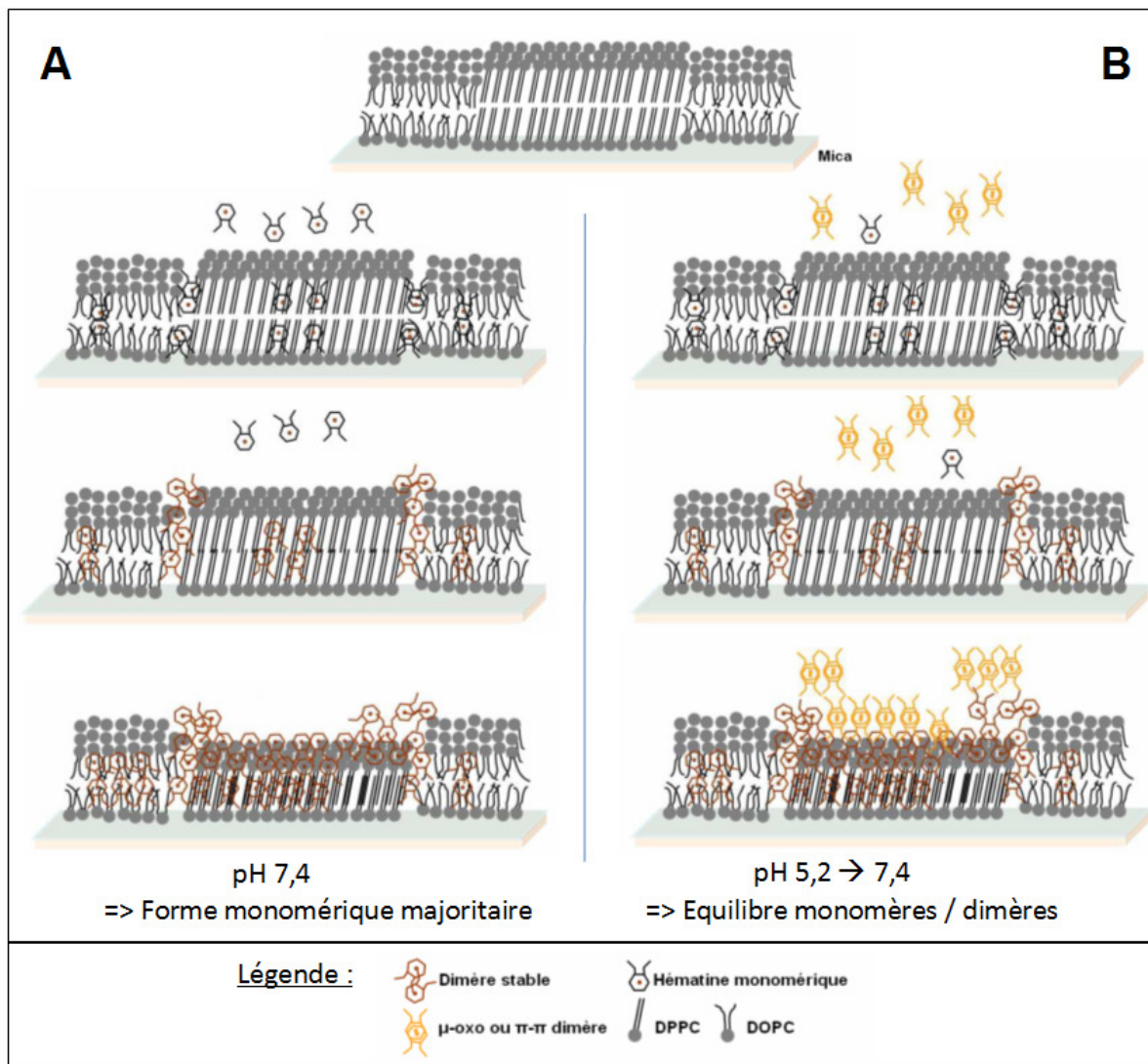


Figure 92. Interprétation proposée des suivis AFM réalisés après injection de l'hématine (à différents pH) sur des SLBs de DOPC/DPPC³⁴

A partir des images AFM réalisées, un schéma interprétant les observations après injection d'une solution d'hématine à différents pH a été proposé. L'incubation à pH 7,4 (à gauche) favorise la présence majoritaire d'hématine monomérique (à gauche). Après injection, celle-ci s'insère massivement dans la bicouche. L'interface fluide/gel favorise sa dimérisation provoquant une rapide nucléation des fibres d'hématine qui se développent rapidement dans la membrane. A l'inverse, la modulation de pH de 5,2 à 7,4 (à droite), bascule l'équilibre vers la formation des dimères d'hématine. L'hématine monomérique, présente en plus faible quantité s'insère dans la membrane mais la nucléation des fibres nécessite plus de temps. Une fois celle-ci amorcée, des fibres d'hématine se développent également dans la membrane. Les dimères présents en solution, incapables de s'insérer dans la bicouche, participent à l'élongation extra-membranaire de la des fibres d'hématine.

³⁴ Mécanisme proposé par Slim AZOUZI dans sa thèse sur la : « Caractérisation des interactions de molécules antipaludiques avec des systèmes membranaires biomimétiques ». 14 décembre 2011.

Enfin, les suivis AFM à différentes concentrations en hématine (de 8 à 20 μM) ont clairement montré l'effet lytique à de fortes concentrations. La dégradation de l'Hb chez le parasite serait régulée et contrôlée, empêchant ainsi une libération trop forte d'hématine conduisant à la lyse des membranes du parasite. Ainsi, la perturbation de la régularisation des enzymes protéolytiques peut être une voie intéressante et vaste³⁵ à explorer dans le développement de nouvelles cibles antipaludiques.

Sur la base de nos résultats et des données bibliographiques, nous avons proposé un mécanisme d'interaction entre les différentes formes d'hématine et les membranes lipidiques de la formation des vésicules cytosomales à la cristallisation de l'Hz (Figure 93). Dans notre hypothèse, la détoxification de l'hématine commencerait dans les vésicules cytosomales, comme l'ont suggéré auparavant l'équipe d'Hempelmann (Hempelmann et al, 2003).

En effet, la formation de ces vésicules, par invagination des membranes de la PV et du parasite, conduit à l'emprisonnement de molécules d'Hb présentes dans le cytoplasme érythrocytaire (Figure 93 1). Nous supposons alors que le pH est de 7,4. Bien que l'activité des enzymes protéolytiques soit favorisée à pH acide, des travaux ont montré qu'elles peuvent être actives à pH neutre (Le Bonniec et al, 1999). Les faibles quantités d'hématine libérées pénétreraient dans la membrane interne (membrane de la VP) et, après nucléation, des fibres se développeraient dans la membrane. L'activation des pompes à protons (dans les vésicules cytosomales) accélérerait la dégradation de l'Hb et perturberait l'équilibre monomère/dimères favorisant la formation de dimères. Ces derniers ainsi générés participeraient alors à l'élongation des fibres présentes au sein de la membrane interne des vésicules (Figure 93 4). Les microcristaux ainsi préformés, seraient libérés dans la VD, à pH acide, et contribueraient à l'élaboration du cristal d'Hz (Figure 93 6).

³⁵ Plusieurs enzymes sont impliquées dans le processus de dégradation de l'hémoglobine. Cf. Partie bibliographique, *V.1.3.1. Digestion de l'hémoglobine*

DISCUSSION

Chapitre II. Rôle des membranes lipidiques dans la détoxification de l'hématine : proposition d'un mécanisme d'action

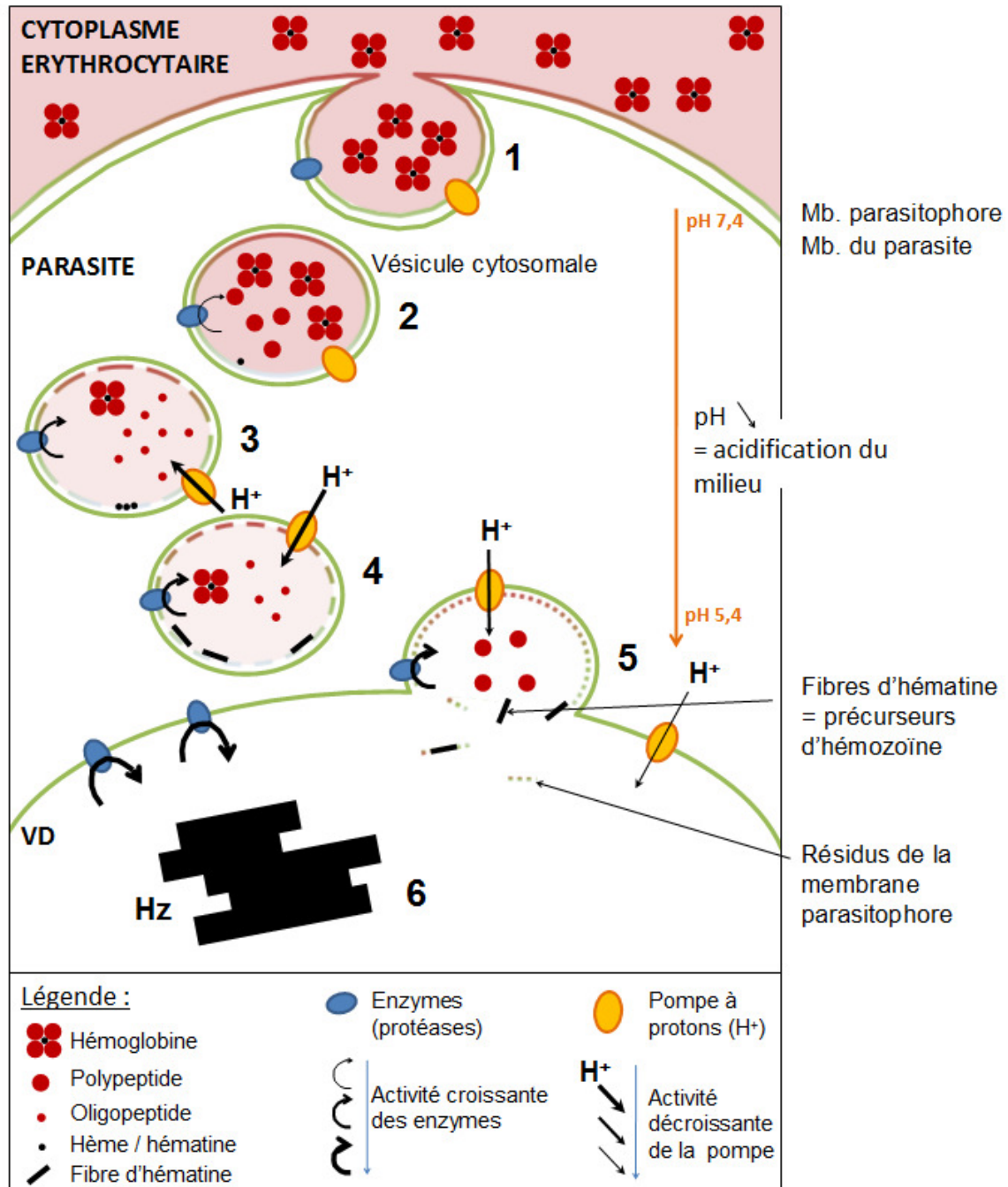


Figure 93. Mécanisme proposé de la formation de fibres d'hématine dans les vésicules cytosomales conduisant à la formation d'hémozoïne dans la VD

La formation des vésicules cytosomales, formées par invagination de la membrane de la VP et du parasite, emprisonne des molécules d'hémoglobine, présente dans le cytoplasme érythrocytaire (1). Le pH des vésicules étant à pH neutre, les enzymes protéolytiques n'ont qu'une activité résiduelle, ne dégradant très peu d'hémoglobine ; l'hème libérée pénètre dans la membrane interne(2). L'activation des pompes à protons, acidifiant le pH des vésicules, active non seulement la dégradation de l'hémoglobine, mais aussi favorise la dimérisation de l'hématine libérée (3). Les dimères d'hématine formés participent à l'élongation des fibres formant ainsi des microcristaux, précurseurs d'hémozoïne (4). Après fusion de la vésicule avec la membrane de la VD, les microcristaux et les résidus de la membrane interne sont libérés (5). Les molécules d'hématine libérée par dégradation d'hémoglobine dans la VD, participent, avec les microcristaux déjà formés à biocristallisation de l'hémozoïne (6).

Ce mécanisme met bien en évidence, l'importance de la membrane interne des vésicules cytosomales, constituant le support nécessaire à la nucléation de fibres comme l'ont évoqué l'équipe d'Egan dans des publications précédentes (Egan et al, 2006). De plus, il montre également le rôle des différentes formes d'hématine majoritairement présentes aux deux pH (pH du cytoplasme érythrocytaire et pH de la VD).

Le mécanisme proposé n'est encore qu'hypothétique. En effet, même si la littérature confirme que l'activité des enzymes est favorisée à pH acide (pH de la VD), le pH de l'intérieur des vésicules cytosomales demeure encore matière à controverse. Ainsi des travaux suggèrent que le pH est neutre jusqu'à la fusion avec la membrane de la VD alors que d'autres évoquent une acidification immédiate grâce à l'activité des pompes à protons (Bakar et al, 2010; Lazarus et al, 2008). L'activité des différentes enzymes dégradant l'Hb au sein des vésicules cytosomales reste ainsi à définir. De plus, l'activité des pompes à protons au sein de ces vésicules doit également être éclaircie. Sont-elles activées pendant le transport de l'Hb du cytoplasme érythrocytaire vers la VD ? Quel élément déclencherait le fonctionnement de ces canaux ? Ce sont autant d'interrogations qui permettront, une fois élucidées, de développer de nouvelles molécules thérapeutiques ciblées.

Selon le mécanisme proposé en Figure 93, les voies potentielles perturbant l'équilibre monomères/dimères, sont soit, comme nous l'avons suggéré précédemment, de cibler les enzymes protéolytiques, soit d'inhiber les pompes à protons. En effet, l'utilisation de molécules inhibant l'échangeur Na^+/H^+ , empêchant ainsi l'acidification du milieu a déjà été suggérée pour le développement de nouvelles cibles antipaludiques (Krogstad et al, 1985). Une telle inhibition de ces pompes pourrait entraîner soit l'inhibition partielle des enzymes protéolytiques (Bakar et al, 2010; Lazarus et al, 2008) soit la perturbation de l'équilibre monomère/dimères empêchant la formation du cristal d'Hz (van Schalkwyk et al, 2013).

Chapitre III. Perturbation de l'intégrité membranaire sous l'effet de NPs : proposition d'un mécanisme d'action

L'approche multitechnique employée dans cette étude nous a permis de montrer les perturbations induites par les NPs sur les membranes lipidiques mimant les vésicules du surfactant pulmonaire ainsi que les membranes cellulaires.

En effet, nous avons, dans un premier temps, évalué la capacité des NPs à perméabiliser les membranes de différentes compositions. D'après les résultats des expérimentations de libération de calcéine, les NPs de TiO₂ d'anatase utilisées³⁶ ne perméabilisent pas significativement les membranes lipidiques mimant les vésicules du surfactant pulmonaire (mélange équimolaire de DOPC/DPPC) ou bien les membranes cellulaires (contenant de la SM avec ou sans Chol). Beaucoup de travaux de recherche divergent sur l'activité lytique des NP de TiO₂. Cependant, les effets mesurés dépendent essentiellement des propriétés physico-chimiques des NPs étudiées (Park et al, 2007), des conditions environnementales (pH, force ioniques...) mais aussi de la nature lipidique ou protéique de la cible (Barillet et al, 2010). Beaucoup de travaux ont démontré l'interaction des NPs avec les membranes de différents types cellulaires conduisant jusqu'à leur internalisation sans jamais provoquer de rupture membranaire (Allouni et al, 2012; Choi et al, 2010).

Malgré l'effet non lytique des NPs utilisées sur les modèles membranaires choisis, nous avons tout de même démontré l'interaction forte entre les NPs de TiO₂ et les vésicules lipidiques, en évaluant le taux d'adsorption des vésicules lipidiques de différentes compositions à la surface des NPs. Avec un taux d'adsorption variant de 50 à 85 % selon la nature des liposomes, nous avons attribué cette forte affinité à l'établissement d'interactions électrostatiques entre les NPs (chargées à pH neutre) et les têtes polaires des phospholipides (Frost et al, 2012). Des résultats complémentaires, utilisant des sondes fluorescentes, nous ont permis d'en déduire

³⁶ Caractérisées par une taille de l'ordre de 500 nm, et un potentiel-zéta de -2 mV, suspendues dans un tampon TBS à pH 7,4

que cette interaction, accentuée au niveau des têtes polaires, provoquait une modification de l'état physique des membranes, traduite par un gain de l'ordre membranaire. Ce phénomène a déjà été rapporté dans la littérature avec des NPs modèles (de polystyrène) également chargées (Wang et al, 2008). Récemment, une autre équipe a démontré l'influence des NPs de silice sur la température de transition de phase des phospholipides membranaires (Westerhausen et al, 2012).

Grâce à l'imagerie AFM, nous avons pu visualiser directement les effets induits par l'interaction des NPs sur les bicouches lipidiques, en accord avec les résultats précédemment obtenus avec les autres techniques biophysiques.

En ce qui concerne la composition mimant les vésicules du surfactant pulmonaire, nous avons pu observer une redistribution légère des lipides à des fortes concentrations en NPs avec même un épaissement hétérogène du domaine principal DPPC, à une température plus élevée et/ou un temps d'incubation plus long. Néanmoins, sur les images AFM, seule la phase gel enrichie en DPPC apparaît épaissie alors que les résultats de fluorescence montrent un gain d'ordre au niveau des têtes polaires plus significatif pour le mélange DOPC/DPPC que la composition de DPPC pur. Ceci peut s'expliquer par le fait que la phase fluide (composée de molécules de DOPC) étant très mobile, l'épaississement ne peut être visualisé à l'AFM surtout en mode contact. A l'inverse, les lipides constituant la phase gel, peu mobiles et très rigides, peuvent conserver cet état ordonné épaissi que nous pouvons visualiser à l'AFM. Ainsi, ce n'est pas parce que la phase fluide n'apparaît pas épaissie sur les images AFM, à quelques endroits, comme les domaines de DPPC, qu'elle n'est pas concernée par l'interaction avec les NPs de TiO₂. Les épaissements observés à l'AFM, ainsi que les gains d'ordre, mesurés au niveau de la partie polaire des lipides, sont donc directement liés aux interactions électrostatiques formées entre les charges négatives présentes à la surface des NPs et les charges positives des groupements choline des phospholipides. Cette interaction conduirait donc au redressement des têtes polaires des lipides, suivi d'un remaniement de l'organisation des lipides au sein de la membrane afin de minimiser les interactions défavorables (Wang et al, 2008). Ainsi, l'ensemble de ces résultats et notamment les observations/interprétations des images AFM, nous ont permis de proposer un mécanisme

DISCUSSION

Chapitre III. Perturbation de l'intégrité membranaire sous l'effet de NPs de TiO_2 : proposition d'un mécanisme d'action

d'interaction (Figure 94) interprétant les changements d'états physiques des lipides constituant le modèle membranaire de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire).

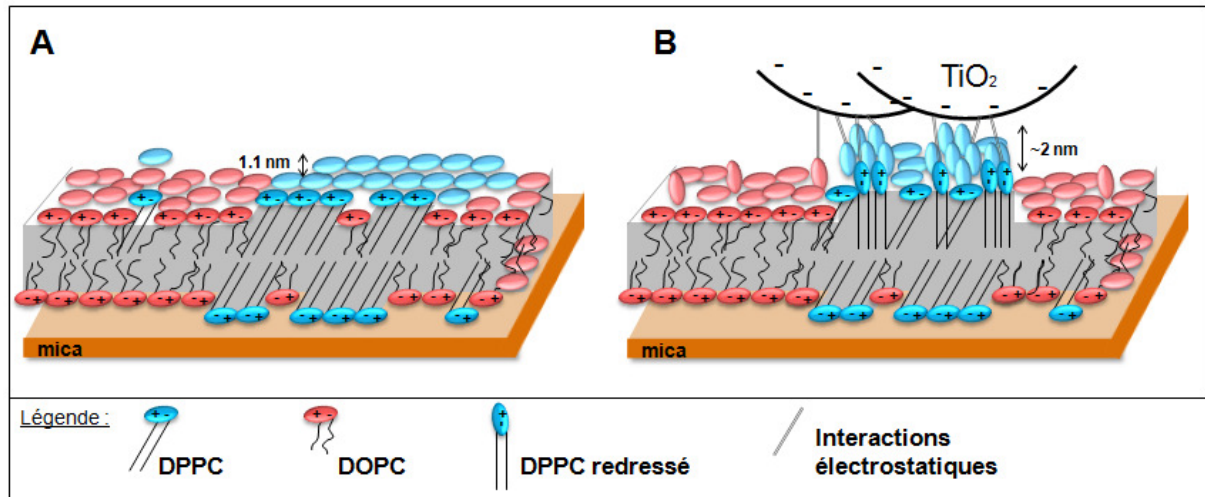


Figure 94. Mécanisme d'interaction proposé entre les NPs de TiO_2 et les membranes de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire)

Les bicouches de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire) mimant les vésicules du surfactant pulmonaire présente une ségrégation de phase entre la phase fluide (enrichie en molécules de DOPC, en rouge) et la phase gel (enrichie, elle, en DPPC, présentés en bleu). Cette différence de hauteur de 1,1 nm avant incubation avec les NPs (A) s'accroît de l'ordre de 1 nm supplémentaire après interaction avec celles-ci (B). Les interactions électrostatiques provoquent le redressement des têtes polaires des phospholipides, induisant par conséquent une diminution de l'angle de « tilt » des chaînes aliphatiques.

Selon le modèle d'interaction proposé, le redressement des têtes polaires serait la conséquence des interactions électrostatiques, établies entre les NPs et le groupement de choline. Les différences de hauteurs mesurées à l'AFM sont de l'ordre de $(1,2 \pm 0,3)$ nm entre la phase gel dite « normale » et la phase gel épaissie. Les chaînes aliphatiques des molécules de DPPC, avant incubation avec les NPs, sont inclinées³⁷ de l'ordre de 30° par rapport à la normale et les têtes polaires s'orientent parallèlement au plan de la bicouche (Figure 94 A) (Somharju et al, 1999). Après incubation avec les NPs, les têtes polaires s'orienteraient perpendiculairement au plan de la bicouche, et par conséquent, les chaînes aliphatiques également, minimisant ainsi l'espace entre les lipides (Figure 94). Le redressement des phospholipides engendrerait une augmentation de la hauteur de la phase gel de l'ordre de 1 nm.

³⁷ Cf. partie bibliographique, I.4.2. Orientation des phospholipides dans la membrane

Nous l'avons au travers des expérimentations AFM, les membranes contenant la SM, mimant les membranes cellulaires, sont plus sensibles aux NPs que les mimes des vésicules du surfactant pulmonaire (contenant le DPPC). En effet, les épaissements survenus, au sein des domaines en phase gel, apparaissent à des temps d'exposition plus courts, ainsi qu'à des concentrations en NPs moins importantes. La particularité des molécules de SM est de pouvoir établir des liaisons H entre l'atome d'azote du noyau sphingosine, et le groupement OH du noyau sphingosine de la SM voisine. Ainsi, même avec une insaturation sur l'une des chaînes aliphatiques, la SM, stabilisée par ces liaisons H, peut s'organiser en phase gel à température ambiante. Outre les interactions électrostatiques, nous avons donc supposé que les molécules de SM pouvaient établir des liaisons H avec les NPs, expliquant l'accentuation des effets observés à l'AFM. Un mécanisme d'interaction interprétant les épaissements progressifs de la périphérie des domaines vers l'intérieur de celui-ci a donc été proposé en Figure 95.

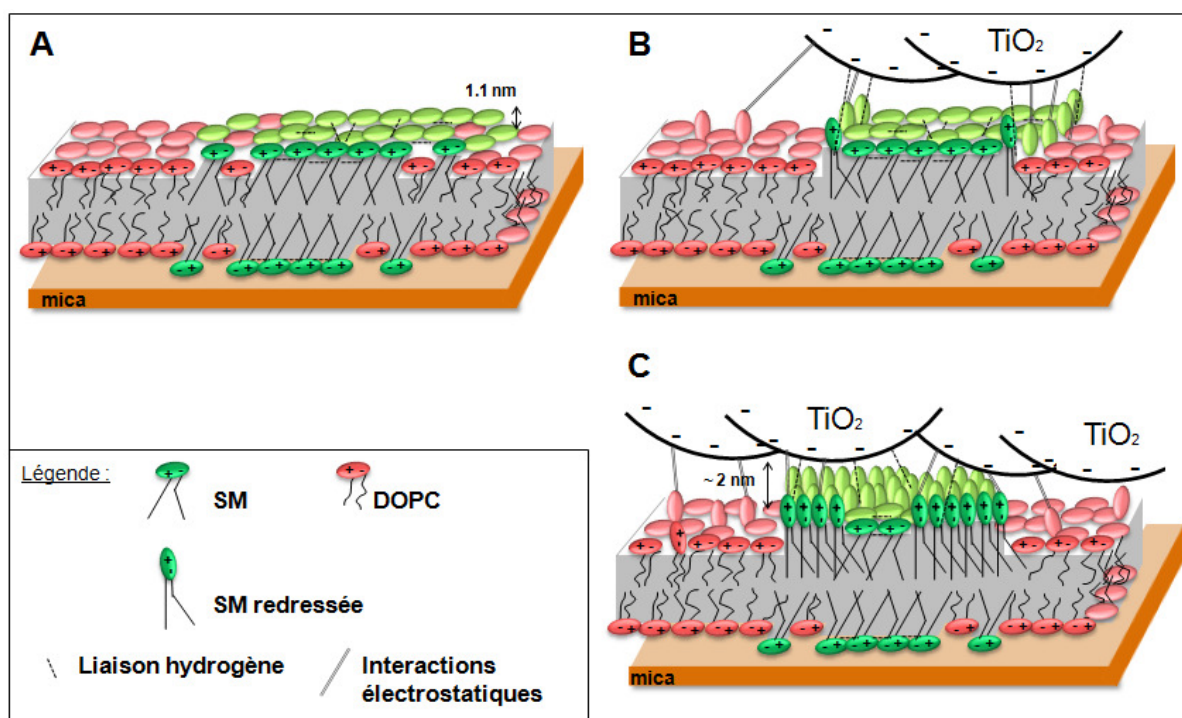


Figure 95. Mécanisme d'interaction proposé entre les NPs de TiO_2 et les membranes de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire)

Les bicouches de DOPC/SM 1:1 (ratio molaire) présente une ségrégation de phase entre la phase fluide (enrichie en molécules de DOPC, en rouge) et la phase gel (enrichie, elle, en SM, présentés en vert). Cette différence de hauteur de 1,1 nm avant incubation avec les NPs (A) s'accroît de l'ordre de 1 nm supplémentaire après interaction avec celles-ci (B et C). Les interactions électrostatiques, s'établissent d'abord avec le DOPC et les molécules de SM à la périphérie des domaines, non stabilisées par les liaisons H (B). A de plus fortes concentrations en NPs, interactions électrostatiques et liaisons H provoquent le redressement de l'ensemble du domaine de SM (C).

DISCUSSION

Chapitre III. Perturbation de l'intégrité membranaire sous l'effet de NPs de TiO₂ : proposition d'un mécanisme d'action

De la même manière que pour l'interaction des NPs avec une bicouche de DOPC/DPPC 1:1 (ratio molaire), l'incubation avec les NPs de TiO₂ provoque un redressement des têtes polaires et par conséquent des chaînes aliphatiques. Les molécules de SM s'organisant de la même manière en phase gel (orientation de la partie polaire et tilt des chaînes hydrophobes) que les molécules de DPPC (Sommerharju et al, 1999), il n'est pas étonnant de mesurer les mêmes différences de hauteur entre la phase non épaissie et la phase épaissie. Selon notre modèle, à de faibles concentrations en NPs, celles-ci interagiraient préférentiellement avec les molécules de SM situées à la périphérie des domaines. En effet, au bord de ces derniers, les molécules de DOPC présentes dans la phase gel empêcheraient certaines molécules de SM de se stabiliser entre elles par des liaisons H ; elles seraient ainsi, plus aptes à interagir avec les NPs (Figure 95 B). A de plus fortes concentrations en NPs, les interactions électrostatiques ainsi que les liaisons H entre SM et NPs se généraliseraient à la quasi-totalité du domaine (Figure 95 C).

La présence de Chol dans les membranes de DOPC/SM, mimant les membranes cellulaires ou les rafts lipidiques selon le taux de Chol, intensifie drastiquement les changements morphologiques au sein des SLBs après exposition aux NPs. En effet, l'incorporation de molécules de Chol dans le mélange, conduit à la formation de petits domaines de taille variable (Figure 96 A). Sous l'effet des NPs, les domaines enrichis en SM et Chol, très mobiles mais compacts, sont regroupés et épaissis même à des très faibles concentrations en NPs.

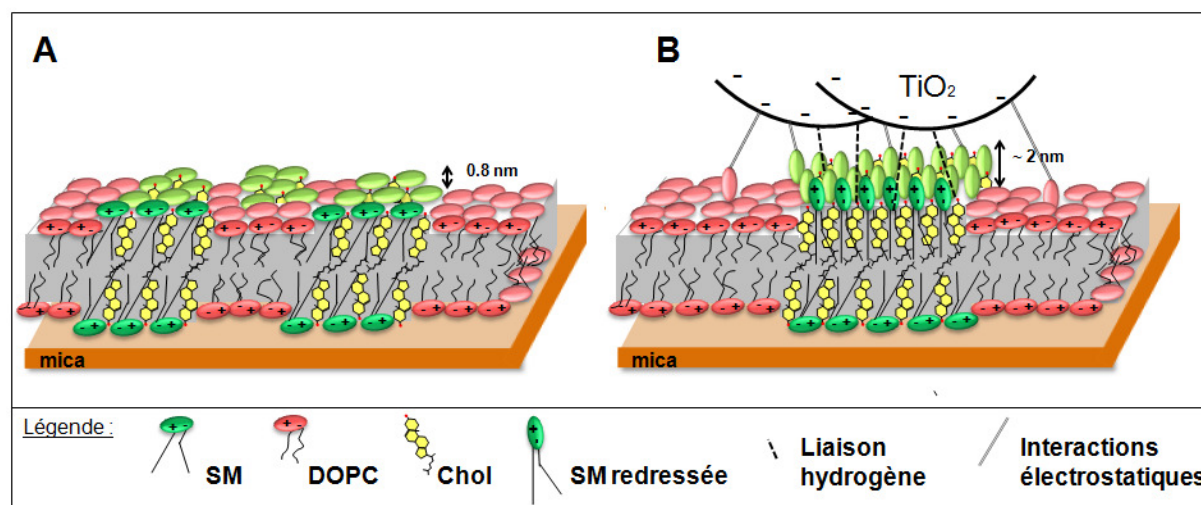


Figure 96. Mécanisme d'interaction proposé entre les NPs de TiO₂ et les membranes de DOPC/SM/Chol
 Les bicouches de DOPC/SM/Chol mimant les membranes cellulaires présente une ségrégation de phase entre la phase fluide (enrichie en molécules de DOPC, en rouge) et la phase Lo (enrichie, elle, en SM et Chol, présentés respectivement en vert et jaune). Cette différence de hauteur de 0,8 nm avant incubation avec les NPs (A) s'accroît de l'ordre de 1 nm supplémentaire après interaction avec celles-ci (B). Les interactions électrostatiques et les liaisons H établies, provoquent d'une part un remaniement profond de l'organisation des domaines au sein de la SLB, ainsi que le redressement des têtes polaires des phospholipides et des chaînes aliphatiques, d'autre part.

Nos avons regroupé ces observations et tenté de les interpréter en proposant un mécanisme d'interaction (Figure 96 B). Il semblerait que la présence de molécules de Chol, s'intercalant entre les molécules de SM dans les domaines en phase Lo, favorise leur interaction avec les NPs, établissant comme précédemment des liaisons H et des interactions électrostatiques. Les domaines en phase Lo, ayant un coefficient de diffusion élevé (Aittoniemi et al, 2007), sont donc capables de se regrouper en un seul domaine de manière à minimiser les interactions défavorables au niveau de la ligne tension formée par la ségrégation de phase. En effet, l'épaississement des domaines en phase Lo, provoque une exposition plus importante des chaînes aliphatiques au milieu aqueux.

Conclusion et perspectives

A travers ces travaux de recherche, nous avons pu voir l'importance d'un outil d'imagerie à haute résolution, qu'est l'AFM, pour élucider des mécanismes d'interaction dans deux études, ciblant deux agents exogènes très différents mais qui interagissent tous deux avec les membranes lipidiques. Associée à d'autres techniques biophysiques (spectroscopie de fluorescence, tensiométrie de surface), l'AFM nous a permis de visualiser directement l'interaction de ces agents exogènes avec des membranes modèles, matérialisé dans le premier cas par la formation de fibres aux interfaces lipidiques et dans le deuxième cas, par l'épaississement et le remaniement des phospholipides.

Au vu de nos résultats et des nombreuses données bibliographiques, le mécanisme de détoxification fait intervenir différentes formes d'hématine qui ont, à chaque étape de ce processus, un rôle clé. Nous l'avons vu à travers les suivis AFM, le rôle déterminant de l'interface lipidique et des lignes de défauts créées par la ségrégation de phase, dans la nucléation de fibres d'hématine. Par la suite, nous avons pu extrapoler ces résultats pour proposer un mécanisme d'action expliquant le rôle des différentes formes d'hématine, modulée par le pH, dans la formation de ces précurseurs d'Hz, au sein des vésicules cytosomales. Parallèlement, l'étude sur l'insertion de l'hématine en présence d'une molécule antipaludique, la CQ, nous a également permis de mieux appréhender le processus de détoxification et d'identifier le rôle des différentes formes d'hématine impliquées dans ce mécanisme.

Nous l'avons vu dans la partie bibliographique (V.1.2. Implication des structures membranaires dans le cycle de développement du parasite), la membrane de la VP est riche en SM et Chol, qui sont recrutés à partir de la membrane érythrocytaire par le parasite. Nous pourrions alors nous interroger sur le rôle potentiel de la SM et du Chol, au sein de la membrane de la PV, dans ce processus de détoxification de l'hématine. En effet, l'utilisation de POPC ou encore d'un modèle comme DOPC/DPPC n'est pas représentatif de la composition lipidique des membranes du parasite. Ainsi, il serait judicieux d'utiliser d'autres modèles mimant véritablement la membrane de la VP.

L'équilibre entre les formes de l'hématine (monomériques et dimériques) constitue la cible principale de la majorité des antipaludéens commercialisés à l'heure actuelle. Les thérapies développées depuis peu utilisent 2-3 molécules antipaludiques palliant les phénomènes de résistance apparus depuis plusieurs années déjà. Ainsi, il est devenu crucial d'utiliser divers antipaludéens dans le même traitement, ayant chacun des cibles différentes (Greenwood et al, 2008), comme des inhibiteurs d'enzymes protéolytiques, ou encore des molécules perturbant la formation du RTV, ou inhibant la formation d'Hz.

Dans un deuxième temps, nos travaux ont porté sur l'interaction des NPs manufacturées de TiO₂ avec des systèmes biologiques dans le cadre d'études toxicologiques, liées à l'émergence des nanotechnologies. Nos résultats, bien que préliminaires, montrent déjà les effets potentiels induits par l'exposition de NPs de TiO₂ sur des modèles lipidiques mimant les membranes biologiques (vésicules lipidiques du surfactant pulmonaire et les membranes cellulaires ou rafts lipidiques).

Deux pistes s'ouvrent en perspective de ces travaux : (i) approfondir les résultats déjà obtenus avec ces NPs de TiO₂ d'anatase ou bien (ii) élargir les travaux de recherche avec des NPs de nature, présentant des propriétés physico-chimiques différentes.

Tout d'abord, en utilisant l'AFM comme outil d'analyse, nous pourrions évaluer l'influence de l'exposition aux NPs de TiO₂ sur les propriétés mécaniques des bicouches, grâce à des mesures de résistance mécanique par indentation de membranes. En greffant des NPs à la surface des pointes, nous pourrions également quantifier les forces d'interactions entre les NPs et les lipides membranaires, grâce à la spectroscopie de force. Ces premiers résultats pourraient être également complétés par d'autres techniques analytiques comme la spectroscopie infrarouge ou RMN pour identifier la nature des liaisons établies dans ce type d'interaction. Nous pourrions également nous intéresser aux perturbations potentielles de ces NPs sur les monocouches lipidiques présentes à l'interface air/surfactant, en utilisant les monocouches de Langmuir. En effet, par des cycles de compression/décompression, nous pourrions mimer les phases d'inspiration et d'expiration et ainsi évaluer les potentielles perturbations de ces cycles, causées par les NPs (Sachan et al, 2012). Tous ces travaux pourraient être réalisés avec des NPs aux caractéristiques variées (reportées dans le Tableau

4). Ainsi, les effets induits pour chacune d'elles pourraient être évalués afin de démontrer l'influence des modifications des propriétés physico-chimiques des NPs.

En termes d'expérimentations complémentaires, il aurait été également intéressant d'évaluer l'effet de l'irradiation UV des NPs, sur les membranes lipidiques. En effet, l'activité photocatalytique des NPs de TiO₂ est notamment une propriété très utilisée en industrie dans le développement de surfaces autonettoyantes ou de cellules photovoltaïques (Chen & Mao, 2007). Capables d'oxyder directement les molécules organiques adsorbées à leur surface, les NPs, soumises au rayonnement UV, pourraient alors altérer profondément les membranes lipidiques (peroxydation des lipides) au contact de celles-ci. Les mesures de fuite de la calcéine ainsi que la visualisation à l'AFM après incubation d'une suspension irradiée pourraient être très intéressantes pour mesurer l'activité photocatalytique des NPs de TiO₂ utilisées.

Enfin, lorsque l'on parle de toxicité de manière générale, nous devons être très vigilants sur les doses employées. Dans notre étude, les concentrations utilisées sont très variables de 1 à plusieurs centaines de µg/mL. De plus, selon le modèle membranaire utilisé, la concentration en phospholipides varie également de l'ordre de 0,5 µM pour l'utilisation de SLBs³⁸ à 1mM pour les liposomes. Aussi, il serait intéressant de prendre en compte dans nos études les doses et les fréquences, afin de se rapprocher des conditions réelles d'exposition, et de vérifier les effets observés après incubation des NPs. Cependant, la quantification de l'exposition (dose, fréquence...) aux NPs de quelque nature que ce soit reste très difficile à établir (Stern & McNeil, 2008)

³⁸ Nous évaluons, tout d'abord, la quantité de phospholipides formant la bicouche sur le support de mica qui représente environ 50 pmol. Le volume, correspondant au volume de la goutte (ménisque) recouvrant la SLB, est, quant à lui, estimé à 150 µL.

Références

Abdulreda MH, Bhalla A, Chapman ER, Moy VT (2008) Atomic Force Microscope Spectroscopy Reveals a Hemifusion Intermediate during Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor-Attachment Protein Receptors-Mediated Membrane Fusion. *Biophysical Journal* **94**: 648-655

Abdulreda MH, Bhalla A, Rico F, Berggren P-O, Chapman ER, Moy VT (2009) Pulling force generated by interacting SNAREs facilitates membrane hemifusion. *Integrative Biology* **1**: 301-310

Acharya A (2013) Luminescent Magnetic Quantum Dots for In Vitro/In Vivo Imaging and Applications in Therapeutics. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **13**: 3753-3768

AFSSET (2006) Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement.

Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, Hong Y (2008) DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and applied pharmacology* **233**: 404-410

Ahn DJ, Franses EI (1992) Orientations of chain axes and transition moments in Langmuir-Blodgett monolayers determined by polarized FTIR-ATR spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry* **96**: 9952-9959

Aittoniemi J, Niemelä PS, Hyvönen MT, Karttunen M, Vattulainen I (2007) Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine. *Biophysical Journal* **92**: 1125-1137

Alessandrini A, Facci P (2012) Nanoscale mechanical properties of lipid bilayers and their relevance in biomembrane organization and function. *Micron* **43**: 1212-1223

Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* **8**: 128-140

Allouni ZE, Høl PJ, Cauqui MA, Gjerdet NR, Cimpan MR (2012) Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO₂ nanoparticles by fibroblasts. *Toxicology in Vitro* **26**: 469-479

Alumasa JN, Gorka AP, Casabianca LB, Comstock E, de Dios AC, Roepe PD (2011) The hydroxyl functionality and a rigid proximal N are required for forming a novel non-covalent quinone-heme complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**: 467-475

Álvarez PM, Jaramillo J, López-Piñero F, Plucinski PK (2010) Preparation and characterization of magnetic TiO₂ nanoparticles and their utilization for the degradation of emerging pollutants in water. *Applied Catalysis B: Environmental* **100**: 338-345

Ambike A, Rosilio Vr, Stella B, Lepêtre-Mouelhi S, Couvreur P (2011) Interaction of self-assembled squalenoyl gemcitabine nanoparticles with phospholipid- cholesterol monolayers mimicking a biomembrane. *Langmuir* **27**: 4891-4899

Ando T (2012) High-speed atomic force microscopy coming of age. *Nanotechnology* **23**: 062001

Ando T, Kodera N, Takai E, Maruyama D, Saito K, Toda A (2001) A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 12468-12472

Arnulphi C, Sot J, García-Pacios M, Arrondo J-LR, Alonso A, Goñi FM (2007) Triton X-100 partitioning into sphingomyelin bilayers at subsolubilizing detergent concentrations: effect of lipid phase and a comparison with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophysical Journal* **93**: 3504

Asher C, de Villiers KA, Egan TJ (2009) Speciation of ferriprotoporphyrin IX in aqueous and mixed aqueous solution is controlled by solvent identity, pH, and salt concentration. *Inorganic chemistry* **48**: 7994-8003

Bagatolli L, Parasassi T, Gratton E (2000) Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods: a two photon fluorescence microscopy study. *Chemistry and physics of lipids* **105**: 135-147

Bagatolli LA, Gratton E (1999) Two-Photon Fluorescence Microscopy Observation of Shape Changes at the Phase Transition in Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal* **77**: 2090-2101

Bagatolli LA, Ipsen JH, Simonsen AC, Mouritsen OG (2010) An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Progress in lipid research* **49**: 378

Bakar NA, Klonis N, Hanssen E, Chan C, Tilley L (2010) Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Cell Science* **123**: 441-450

Balashov K, Atanasov V, Mitewa M, Petrova S, Bjørnholm T (2011) Kinetics of degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers as a result of vipoxin phospholipase A2 activity: An atomic force microscopy (AFM) approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**: 191-198

Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Mayne-L'Hermite M, Reynaud C, Cassio D, Gouget B, Carrière M (2010) Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. *Journal of Nanoparticle Research* **12**: 61-73

Baroli B (2010) Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? *Journal of pharmaceutical sciences* **99**: 21-50

Bensikaddour H, Fa N, Burton I, Deleu M, Lins L, Schanck A, Brasseur R, Dufrêne YF, Goormaghtigh E, Mingeot-Leclercq M-P (2008) Characterization of the interactions between fluoroquinolone antibiotics and lipids: a multitechnique approach. *Biophysical Journal* **94**: 3035-3046

Bernchou U, Brewer J, Midtby HS, Ipsen JH, Bagatolli LA, Simonsen AC (2009a) Texture of lipid bilayer domains. *Journal of the American Chemical Society* **131**: 14130-14131

Bernchou U, Ipsen JH, Simonsen AC (2009b) Growth of solid domains in model membranes: quantitative image analysis reveals a strong correlation between domain shape and spatial position. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**: 7170-7177

Beydoun D, Amal R, Low G, McEvoy S (1999) Role of nanoparticles in photocatalysis. *Journal of Nanoparticle Research* **1**: 439-458

Bignozzi CA, Carinci F, Caramori S, Dissette V. (2012) Use of nanomaterials based on titanium dioxide and zirconium dioxide as coatings for osteointegrated biomedical prostheses, and osteointegrated biomedical prostheses prepared therewith. USPTO Patent Application US 2009/0270997 A1

Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic force microscope. *Physical review letters* **56**: 930-933

Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E (1982) Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical review letters* **49**: 57-61

-
- Blanchette CD, Lin W-C, Orme CA, Ratto TV, Longo ML (2007) Using nucleation rates to determine the interfacial line tension of symmetric and asymmetric lipid bilayer domains. *Langmuir* **23**: 5875-5877
- Blanchette CD, Lin W-C, Orme CA, Ratto TV, Longo ML (2008a) Domain nucleation rates and interfacial line tensions in supported bilayers of ternary mixtures containing galactosylceramide. *Biophysical Journal* **94**: 2691
- Blanchette CD, Lin W-C, Ratto TV, Longo ML (2006) Galactosylceramide domain microstructure: impact of cholesterol and nucleation/growth conditions. *Biophysical Journal* **90**: 4466-4478
- Blanchette CD, Orme CA, Ratto TV, Longo ML (2008b) Quantifying growth of symmetric and asymmetric lipid bilayer domains. *Langmuir* **24**: 1219-1224
- Blodgett KB, Langmuir I (1937) Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Physical Review* **51**: 964
- Boas U, Heegaard PM (2004) Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews* **33**: 43-63
- Brown D, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology* **14**: 111-136
- Brown SC, Palazuelos M, Sharma P, Powers KW, Roberts SM, Grobmyer SR, Moudgil BM (2010) Nanoparticle characterization for cancer nanotechnology and other biological applications. In *Cancer Nanotechnology*, pp 39-65. Springer
- Bruun Nielsen MM, Simonsen AC (2013) Imaging ellipsometry of spincoated membranes: Mapping of multilamellar films, hydrated membranes and fluid domains. *Langmuir* **29**: 1525-1532
- Cadenhead D, Muller-Landau F, Kellner B (1974) Bilayers at the air-water interface? *Nature* **252**: 694-696
- Canale C, Jacono M, Diaspro A, Dante S (2010) Force spectroscopy as a tool to investigate the properties of supported lipid membranes. *Microscopy research and technique* **73**: 965-972
- Casabianca LB, An D, Natarajan JK, Alumasa JN, Roepe PD, Wolf C, Dios ACd (2008) Quinine and chloroquine differentially perturb heme monomer– dimer equilibrium. *Inorganic chemistry* **47**: 6077-6081

- Cha T, Guo A, Zhu X-Y (2006) Formation of supported phospholipid bilayers on molecular surfaces: role of surface charge density and electrostatic interaction. *Biophysical Journal* **90**: 1270-1274
- Chang S, Singamaneni S, Kharlampieva E, Young SL, Tsukruk VV (2009) Responsive hybrid nanotubes composed of block copolymer and gold nanoparticles. *Macromolecules* **42**: 5781-5785
- Chen X, Mao SS (2007) Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical Reviews* **107**: 2891-2959
- Chiantia S, Ries J, Chwastek G, Carrer D, Li Z, Bittman R, Schwille P (2008) Role of ceramide in membrane protein organization investigated by combined AFM and FCS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1778**: 1356-1364
- Chicon R, Ortuno M, Abellan J (1987) An algorithm for surface reconstruction in scanning tunneling microscopy. *Surface Science* **181**: 107-111
- Chithrani BD, Chan WC (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters* **7**: 1542-1550
- Choi EJ, Dimitriadis EK (2004) Cytochrome c Adsorption to Supported, Anionic Lipid Bilayers Studied via Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **87**: 3234-3241
- Choi HS, Ashitate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, Bawendi MG, Semmler-Behnke M, Frangioni JV, Tsuda A (2010) Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nature biotechnology* **28**: 1300-1303
- Chou A, Fitch C (1980) Hemolysis of mouse erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX and chloroquine. Chemotherapeutic implications. *Journal of Clinical Investigation* **66**: 856
- Choucair A, Chakrapani M, Chakravarthy B, Katsaras J, Johnston LJ (2007) Preferential accumulation of A β (1-42) on gel phase domains of lipid bilayers: An AFM and fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**: 146-154
- Chtcheglova LA, Waschke J, Wildling L, Drenckhahn D, Hinterdorfer P (2007) Nano-Scale Dynamic Recognition Imaging on Vascular Endothelial Cells. *Biophysical Journal* **93**: L11-L13
- Cormode DP, Jarzyna PA, Mulder WJ, Fayad ZA (2010) Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**: 329-338

Crane JM, Tamm LK (2007) Fluorescence microscopy to study domains in supported lipid bilayers. In *Methods in Membrane Lipids*, pp 481-488. Springer

Creuwels L, Van Golde L, Haagsman H (1997) The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* **175**: 1-39

Dague E, Bitar R, Ranchon H, Durand F, Yken HM, François JM (2010) An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. *Yeast* **27**: 673-684

Dante S, Hauß T, Steitz R, Canale C, Dencher NA (2011) Nanoscale structural and mechanical effects of beta-amyloid (1-42) on polymer cushioned membranes: A combined study by neutron reflectometry and AFM Force Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1808**: 2646-2655

Datta SS, Strachan DR, Mele E, Johnson AC (2008) Surface potentials and layer charge distributions in few-layer graphene films. *Nano letters* **9**: 7-11

Dawson KA, Salvati A, Lynch I (2009) Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nature nanotechnology* **4**: 84-85

de Almeida RF, Loura L, Fedorov A, Prieto M (2005) Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *Journal of molecular biology* **346**: 1109-1120

Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F (2005) Interactions of primary amphipathic cell penetrating peptides with model membranes: consequences on the mechanisms of intracellular delivery of therapeutics. *Current pharmaceutical design* **11**: 3629-3638

Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K (2002) Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophysical Journal* **82**: 274

Dillemath J, Frederick S, Parker R, Gereffi G, Appelbaum R (2011) Traveling technologies: Societal implications of nanotechnology through the global value chain. *Journal of Nano Education* **3**: 1-2

Divya Rani V, Vinoth-Kumar L, Anitha V, Manzoor K, Deepthy M, Shantikumar VN (2012) Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology. *Acta biomaterialia* **8**: 1976-1989

Domenech O, Dufrêne YF, Van Bambeke F, Tukens PM, Mingeot-Leclercq M-P (2010) Interactions of oritavancin, a new semi-synthetic lipoglycopeptide, with lipids extracted from

Staphylococcus aureus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1798**: 1876-1885

Domenech O, Francius G, Tulkens PM, Van Bambeke F, Dufrêne Y, Mingeot-Leclercq M-P (2009) Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers: effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1788**: 1832-1840

Doniach S (1979) A thermodynamic model for the monoclinic (ripple) phase of hydrated phospholipid bilayers. *The Journal of Chemical Physics* **70**: 4587

Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG (1995) Malarial haemozoin/ β -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* **374**: 269-271

Drake B, Prater C, Weisenhorn A, Gould S, Albrecht T, Quate C, Cannell D, Hansma H, Hansma P (1989) Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science* **243**: 1586-1589

Dubar F, Egan TJ, Pradines B, Kuter D, Ncokazi KK, Forge D, Paul J-Fo, Pierrot C, Kalamou H, Khalife J (2011) The antimalarial ferroquine: role of the metal and intramolecular hydrogen bond in activity and resistance. *ACS Chemical Biology* **6**: 275-287

Dufrêne YF, Barger WR, Green J-BD, Lee GU (1997) Nanometer-scale surface properties of mixed phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir* **13**: 4779-4784

Dufrene YF, Boland T, Schneider JW, Barger WR, Lee GU (1999) Characterization of the physical properties of model biomembranes at the nanometer scale with the atomic force microscope. *Faraday discussions* **111**: 79-94

Dupres V, Menozzi FD, Locht C, Clare BH, Abbott NL, Cuenot S, Bompard C, Raze D, Dufrêne YF (2005) Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nature methods* **2**: 515-520

Ebner A, Madl J, Kienberger F, Chtcheglova LA, Puntheeranurak T, Zhu R, Tang J, Gruber HJ, Schutz GJ, Hinterdorfer P (2007) Single molecule force microscopy on cells and biological membranes. *Current Nanoscience* **3**: 49-56

Ebner A, Wildling L, Zhu R, Rankl C, Haselgrübler T, Hinterdorfer P, Gruber HJ (2008) Functionalization of probe tips and supports for single-molecule recognition force microscopy. In *Stm And Afm Studies On (Bio) Molecular Systems: Unravelling The Nanoworld*, pp 29-76. Springer

-
- Eeman M, Deleu M (2010) From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **14**: 719-736
- Egan TJ (2008a) Haemozoin formation. *Molecular and biochemical parasitology* **157**: 127-136
- Egan TJ (2008b) Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *Journal of Inorganic Biochemistry* **102**: 1288-1299
- Egan TJ, Chen JY, de Villiers KA, Mabothe TE, Naidoo KJ, Ncokazi KK, Langford SJ, McNaughton D, Pandiancherri S, Wood BR (2006) Haemozoin (β -haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. *FEBS letters* **580**: 5105-5110
- Egan TJ, Combrinck JM, Egan J, Hearne GR, Marques HM, Ntente S, Sewell BT, Smith PJ, Taylor D, van Schalkwyk DA (2002) Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical journal* **365**: 343
- Egan TJ, Mavuso WW, Ncokazi KK (2001) The mechanism of β -hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes. *Biochemistry* **40**: 204-213
- Egan TJ, Ncokazi KK (2005) Quinoline antimalarials decrease the rate of β -hematin formation. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**: 1532-1539
- El Kirat K, Besson F, Prigent A-F, Chauvet J-P, Roux B (2002) Role of Calcium and Membrane Organization on Phospholipase D Localization and Activity COMPETITION BETWEEN A SOLUBLE AND AN INSOLUBLE SUBSTRATE. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 21231-21236
- El Kirat K, Chauvet J-P, Roux B, Besson F (2004) *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D interaction with lipidic activators at the air–water interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1661**: 144-153
- El Kirat K, Dufrêne YF, Lins L, Brasseur R (2006) The SIV tilted peptide induces cylindrical reverse micelles in supported lipid bilayers. *Biochemistry* **45**: 9336-9341
- El Kirat K, Duprès V, Dufrêne YF (2008) Blistering of supported lipid membranes induced by Phospholipase D, as observed by real-time atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1778**: 276-282

-
- El Kirat K, Morandat S (2007) Cholesterol modulation of membrane resistance to Triton X-100 explored by atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1768**: 2300-2309
- El Kirat K, Morandat S, Dufrière YF (2010) Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. *Biochimica et biophysica acta* **1798**: 750
- Elsaesser A, Howard CV (2012) Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**: 129-137
- Engel A (1991) Biological applications of scanning probe microscopes. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* **20**: 79-108
- Fang C, Zhang M (2009) Multifunctional magnetic nanoparticles for medical imaging applications. *Journal of Materials Chemistry* **19**: 6258-6266
- Fateh R, Ismail AA, Dillert R, Bahnemann DW (2011) Highly Active Crystalline Mesoporous TiO₂ Films Coated onto Polycarbonate Substrates for Self-Cleaning Applications. *The Journal of Physical Chemistry C* **115**: 10405-10411
- Faustini M, Nicole L, Boissière Cd, Innocenzi P, Sanchez C, Grosso D (2010) Hydrophobic, antireflective, self-cleaning, and antifogging sol–gel coatings: an example of multifunctional nanostructured materials for photovoltaic cells. *Chemistry of Materials* **22**: 4406-4413
- Francis SE, Sullivan Jr DJ, Goldberg, E D (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Annual Reviews in Microbiology* **51**: 97-123
- Frankel D, Pfeiffer J, Surviladze Z, Johnson A, Oliver J, Wilson B, Burns A (2006) Revealing the topography of cellular membrane domains by combined atomic force microscopy/fluorescence imaging. *Biophysical Journal* **90**: 2404-2413
- Frost R, Jönsson GE, Chakarov D, Svedhem S, Kasemo B (2012) Graphene oxide and lipid membranes: interactions and nanocomposite structures. *Nano letters* **12**: 3356-3362
- Gaboriaud F, Bailet S, Dague E, Jorand F (2005) Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy. *Journal of bacteriology* **187**: 3864-3868
- Gaffet E (2008) Nanomatériaux: différentes voies de synthèse, propriétés, applications et marchés. *Actualité et dossier*

Gaiduk A, Kühnemuth R, Antonik M, Seidel CA (2005) Optical Characteristics of Atomic Force Microscopy Tips for Single-Molecule Fluorescence Applications. *ChemPhysChem* **6**: 976-983

Garcia-Manyes S, Oncins G, Sanz F (2005a) Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical Journal* **89**: 1812-1826

Garcia-Manyes S, Oncins G, Sanz F (2005b) Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical Journal* **89**: 4261-4274

Garcia-Manyes S, Oncins G, Sanz F (2006) Effect of pH and ionic strength on phospholipid nanomechanics and on deposition process onto hydrophilic surfaces measured by AFM. *Electrochimica Acta* **51**: 5029-5036

Garcia-Manyes S, Redondo-Morata L, Oncins G, Sanz F (2010) Nanomechanics of lipid bilayers: heads or tails? *Journal of the American Chemical Society* **132**: 12874-12886

Gebhardt C, Gruler H, Sackmann E (1977) On domain structure and local curvature in lipid bilayers and biological membranes. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C: Biosciences* **32**: 581

Gerhardt L-C, Jell G, Boccaccini A (2007) Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles filled poly (D, L lactic acid)(PDLLA) matrix composites for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **18**: 1287-1298

Gillies ER, Frechet JM (2005) Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug discovery today* **10**: 35-43

Ginsburg H, Demel R (1983) The effect of ferriprotoporphyrin IX and chloroquine on phospholipid monolayers and the possible implications to antimalarial activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **732**: 316-319

Giocondi M-C, Vié V, Lesniewska E, Milhiet P-E, Zinke-Allmang M, Le Grimellec C (2001) Phase Topology and Growth of Single Domains in Lipid Bilayers. *Langmuir* **17**: 1653-1659

Giocondi M-C, Yamamoto D, Lesniewska E, Milhiet P-E, Ando T, Le Grimellec C (2010) Surface topography of membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1798**: 703-718

Giroud J-P, Mathé G, Meyniel G (1978) Pharmacologie clinique: bases de la thérapeutique.

Goerke J (1998) Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1408**: 79-89

Goksu EI, Vanegas JM, Blanchette CD, Lin W-C, Longo ML (2009) AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1788**: 254-266

Gorka AP, de Dios AC, Roepe PD (2013) Quinoline Drug-Heme Interactions and Implications for Antimalarial Cytostatic versus Cytocidal Activities. *Journal of medicinal chemistry* **56**: 5231-5246

Gorter E, Grendel F (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *The Journal of experimental medicine* **41**: 439-443

Grandbois M, Clausen-Schaumann H, Gaub H (1998) Atomic Force Microscope Imaging of Phospholipid Bilayer Degradation by Phospholipase A₂. *Biophysical Journal* **74**: 2398-2404

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE (2008) Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of clinical investigation* **118**: 1266

Gurr J-R, Wang AS, Chen C-H, Jan K-Y (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* **213**: 66-73

Gurtovenko AA, Vattulainen I (2008) Effect of NaCl and KCl on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine lipid membranes: insight from atomic-scale simulations for understanding salt-induced effects in the plasma membrane. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**: 1953-1962

Guzmán E, Liggieri L, Santini E, Ferrari M, Ravera F (2012) DPPC–DOPC Langmuir monolayers modified by hydrophilic silica nanoparticles: Phase behaviour, structure and rheology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **413**: 174-183

Haldar K, Mohandas N, Samuel BU, Harrison T, Hiller NL, Akompong T, Cheres P (2002) Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cellular microbiology* **4**: 383-395

Haselgruebler T, Amerstorfer A, Schindler H, Gruber HJ (1995) Synthesis and applications of a new poly (ethylene glycol) derivative for the crosslinking of amines with thiols. *Bioconjugate chemistry* **6**: 242-248

He Q, Li J (2003) Dynamic and morphological investigation of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300**: 541-545

Hecht E, Thompson K, Frick M, Wittekindt OH, Dietl P, Mizaikoff B, Kranz C (2012) Combined Atomic Force Microscopy–Fluorescence Microscopy: Analyzing Exocytosis in Alveolar Type II Cells. *Analytical chemistry* **84**: 5716-5722

Heimburg T (2000) A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical Journal* **78**: 1154-1165

Hempelmann E, Motta C, Hughes R, Ward SA, Bray PG (2003) *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? *Trends in parasitology* **19**: 23-26

Hernando J, de Witte PA, van Dijk EM, Korterik J, Nolte RJ, Rowan AE, García-Parajó MF, van Hulst NF (2004) Investigation of Perylene Photonic Wires by Combined Single-Molecule Fluorescence and Atomic Force Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **43**: 4045-4049

Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, Schilcher K, Schindler H (1996) Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 3477-3481

Hinterdorfer P, Dufrêne YF (2006) Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature methods* **3**: 347-355

Hjort Ipsen J, Karlström G, Mourtisen O, Wennerström H, Zuckermann M (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **905**: 162-172

Hoang AN, Ncokazi KK, de Villiers KA, Wright DW, Egan TJ (2010a) Crystallization of synthetic haemozoin (β -haematin) nucleated at the surface of lipid particles. *Dalton Transactions* **39**: 1235-1244

Hoang AN, Sandlin RD, Omar A, Egan TJ, Wright DW (2010b) The neutral lipid composition present in the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* concentrates heme and mediates β -hematin formation with an unusually low activation energy. *Biochemistry* **49**: 10107-10116

Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, Balogh L, Orr BG, Baker JR, Banaszak Holl MM (2004) Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. *Bioconjugate chemistry* **15**: 774-782

Horn RG (1984) Direct measurement of the force between two lipid bilayers and observation of their fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **778**: 224-228

Howell M, Wang C, Mahmoud A, Hellermann G, Mohapatra S, Mohapatra S (2013) Dual-function theranostic nanoparticles for drug delivery and medical imaging contrast: perspectives and challenges for use in lung diseases. *Drug Delivery and Translational Research*: 1-12

Hsiao L, Howard R, Aikawa M, Taraschi T (1991) Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical journal* **274**: 121

Huang C-H (1969) Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* **8**: 344-352

Huy NT, Takano R, Hara S, Kamei K (2004) Enhancement of Heme-Induced Membrane Damage by the Anti-malarial Clotrimazole: the Role of Colloid-Osmotic Forces. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **27**: 361-365

Ip S, Li JK, Walker GC (2010) Phase Segregation of Untethered Zwitterionic Model Lipid Bilayers Observed on Mercaptoundecanoic-Acid-Modified Gold by AFM Imaging and Force Mapping. *Langmuir* **26**: 11060-11070

Jeng HA, Swanson J (2006) Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health Part A* **41**: 2699-2711

Jin J, Li LS, Wang X, Li Y, Zhang YJ, Chen X, Li Y-z, Li TJ (1999) Steady-State Spectroscopic and Photovoltage Studies of Hemin and Hemin/n-Octadecylamine Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir* **15**: 6969-6974

Kaasgaard T, Leidy C, Crowe JH, Mouritsen OG, Jørgensen K (2003) Temperature-Controlled Structure and Kinetics of Ripple Phases in One- and Two-Component Supported Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **85**: 350-360

Kaemmer SB (2011) Introduction to Bruker's ScanAsyst and PeakForce tapping AFM technology. *Bruker application note Bruker Nano Inc, Santa Barbara, CA*

Kalyanasundaram K, Graetzel M (2010) Artificial photosynthesis: biomimetic approaches to solar energy conversion and storage. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 298-310

Kamiguchi H (2006) The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. *Journal of neurochemistry* **98**: 330-335

Kauffman JM, Westerman PW, Carey MC (2000) Fluorocholesterols, in contrast to hydroxycholesterols, exhibit interfacial properties similar to cholesterol. *Journal of lipid research* **41**: 991-1003

Keller C, Kasemo B (1998) Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal* **75**: 1397-1402

Kienberger F, Ebner A, Gruber HJ, Hinterdorfer P (2006) Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecules. *Accounts of chemical research* **39**: 29-36

Kienberger F, Kada G, Mueller H, Hinterdorfer P (2005) Single Molecule Studies of Antibody–Antigen Interaction Strength Versus Intra-molecular Antigen Stability. *Journal of molecular biology* **347**: 597-606

Klonis N, Dilanian R, Hanssen E, Darmanin C, Streltsov V, Deed S, Quiney H, Tilley L (2010) Hematin– Hematin Self-Association States Involved in the Formation and Reactivity of the Malaria Parasite Pigment, Hemozoin. *Biochemistry* **49**: 6804-6811

Knoll W, Köper I, Naumann R, Sinner E-K (2008) Tethered bimolecular lipid membranes—a novel model membrane platform. *Electrochimica Acta* **53**: 6680-6689

Kobljanskyj Y, Melkov G, Guslienko K, Novosad V, Bader SD, Kostylev M, Slavin A (2012) Nano-structured magnetic metamaterial with enhanced nonlinear properties. *Scientific reports* **2**: 1-6

Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T (2010) Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* **468**: 72-76

Kozlova NO, Bruskovskaya IB, Okuneva IB, Melik-Nubarov NS, Yaroslavov AA, Kabanov VA, Menger FM (2001) Interaction of a cationic polymer with negatively charged proteoliposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1514**: 139-151

Krogstad DJ, Schlesinger PH, Gluzman IY (1985) Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum*. *The Journal of cell biology* **101**: 2302-2309

Lahmani M, Bréchnignac C, Houdy P (2006) *Les nanosciences: 2 Nanomatériaux et nanochimie*, Vol. 2, Belin edn.

Langmuir I (1917) The shapes of group molecules forming the surfaces of liquids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **3**: 251

Lanone S, Boczkowski J (2011) Titanium and gold nanoparticles in asthma: the bad and the ugly. *European Respiratory Journal* **37**: 225-227

Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G (2009) Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* **255**: 33-37

Lazarus MD, Schneider TG, Taraschi TF (2008) A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Cell Science* **121**: 1937-1949

Le Bonniec S, Deregnaucourt C, Redeker V, Banerjee R, Grellier P, Goldberg DE, Schrével J (1999) Plasmepsin II, an Acidic Hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* Food Vacuole, Is Active at Neutral pH on the Host Erythrocyte Membrane Skeleton. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 14218-14223

Le Bras J, Musset L, Clain J (2006) Les résistances aux médicaments antipaludiques. *Médecine et Maladies Infectieuses* **36**: 401-405

Lee G, Nowak W, Jaroniec J, Zhang Q, Marszalek PE (2004) Molecular Dynamics Simulations of Forced Conformational Transitions in 1,6-Linked Polysaccharides. *Biophysical Journal* **87**: 1456-1465

Lee GU, Chrisey LA, Colton RJ (1994) Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* **266**: 771-773

Leidy C, Mouritsen OG, Jørgensen K, Peters GH (2004) Evolution of a Rippled Membrane during Phospholipase A₂ Hydrolysis Studied by Time-Resolved AFM. *Biophysical Journal* **87**: 408-418

Lentz B, Freire E, Biltonen R (1978) Fluorescence and calorimetric studies of phase transitions in phosphatidylcholine multilayers: kinetics of the pretransition. *Biochemistry* **17**: 4475-4480

-
- Leonenko Z, Finot E, Ma H, Dahms T, Cramb D (2004) Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophysical Journal* **86**: 3783-3793
- Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, Baker JR, Orr BG, Banaszak Holl MM (2008) Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano letters* **8**: 420-424
- Leroueil PR, Hong S, Mecke A, Baker Jr JR, Orr BG, Banaszak Holl MM (2007) Nanoparticle interaction with biological membranes: Does nanotechnology present a janus face? *Accounts of chemical research* **40**: 335-342
- Li J, Chen Z, Wang X, Brezesinski G, Möhwald H (2000) Dynamic observations of the hydrolysis of a DPPC monolayer at the air/water interface catalyzed by phospholipase A2. *Angewandte Chemie International Edition* **39**: 3059-3062
- Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Lanry Yung LY (2008) Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro. *Advanced Materials* **20**: 138-142
- Li S, Malmstadt N (2013) Deformation and poration of lipid bilayer membranes by cationic nanoparticles. *Soft Matter* **9**: 4969-4976
- Lin W-C, Blanchette CD, Longo ML (2007) Fluid-phase chain unsaturation controlling domain microstructure and phase in ternary lipid bilayers containing GalCer and cholesterol. *Biophysical Journal* **92**: 2831-2841
- Lin W-C, Blanchette CD, Ratto TV, Longo ML (2006) Lipid Asymmetry in DLPC/DSPC-Supported Lipid Bilayers: A Combined AFM and Fluorescence Microscopy Study. *Biophysical Journal* **90**: 228-237
- Linsebigler AL, Lu G, Yates Jr JT (1995) Photocatalysis on TiO₂ surfaces: principles, mechanisms, and selected results. *Chemical Reviews* **95**: 735-758
- Lösche M, Rabe J, Fischer A, Rucha B, Knoll W, Möhwald H (1984) Microscopically observed preparation of Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films* **117**: 269-280
- Lubensky T, MacKintosh F (1993) Theory of “ripple” phases of lipid bilayers. *Physical review letters* **71**: 1565-1568
- Luckey M (2008) *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations*: Cambridge University Press. 344 pages

-
- Madl J, Rhode S, Stangl H, Stockinger H, Hinterdorfer P, Schütz GJ, Kada G (2006) A combined optical and atomic force microscope for live cell investigations. *Ultramicroscopy* **106**: 645-651
- Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N (2002) Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 1943-1948
- Mao Y, Shang Z, Imai Y, Hoshino T, Tero R, Tanaka M, Yamamoto N, Yanagisawa K, Urisu T (2010) Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerates A β oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1798**: 1090-1099
- Marsh D (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1286**: 183-223
- Mason RP, Shoemaker WJ, Shajenko L, Chambers TE, Herbette LG (1992) Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiology of Aging* **13**: 413-419
- Maynard AD (2007) Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing? *Annals of Occupational Hygiene* **51**: 1-12
- Maynard RL (2012) Nano-technology and nano-toxicology. *Emerging Health Threats Journal* **5**: 17508
- McConlogue CW, Vanderlick TK (1997) A close look at domain formation in DPPC monolayers. *Langmuir* **13**: 7158-7164
- McIntosh T (1980) Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing model. *Biophysical Journal* **29**: 237-245
- Medalsy ID, Müller DJ (2013) Nanomechanical Properties of Proteins and Membranes Depend on Loading Rate and Electrostatic Interactions. *ACS nano* **7**: 2642-2650
- Milhiet P-E, Giocondi M-C, Baghdadi O, Ronzon F, Roux B, Le Grimmellec C (2002) Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. *EMBO reports* **3**: 485-490

-
- Milhiet PE, Domec C, Giocondi M-C, Van Mau N, Heitz F, Grimellec CL (2001) Domain Formation in Models of the Renal Brush Border Membrane Outer Leaflet. *Biophysical Journal* **81**: 547-555
- Moraille P, Badia A (2005) Enzymatic lithography of phospholipid bilayer films by stereoselective hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 6546-6547
- Morandat S, Azouzi S, Beauvais E, Mastouri A, El Kirat K (2013) Atomic force microscopy of model lipid membranes. *Anal Bioanal Chem* **405**: 1445-1461
- Morandat S, El Kirat K (2006) Membrane resistance to Triton X-100 explored by real-time atomic force microscopy. *Langmuir* **22**: 5786-5791
- Morgera F, Vaccari L, Antcheva N, Scaini D, Pacor S, Tossi A (2009) Primate cathelicidin orthologues display different structures and membrane interactions. *Biochem J* **417**: 727-735
- Mou J, Czajkowsky DM, Shao Z (1996) Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* **35**: 3222-3226
- Mou J, Yang J, Huang C, Shao Z (1994a) Alcohol induces interdigitated domains in unilamellar phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* **33**: 9981-9985
- Mou J, Yang J, Shao Z (1994b) Tris (hydroxymethyl) aminomethane (C₄H₁₁NO₃) induced a ripple phase in supported unilamellar phospholipid bilayers. *Biochemistry* **33**: 4439-4443
- Müller P, Herrmann A (2002) Rapid Transbilayer Movement of Spin-Labeled Steroids in Human Erythrocytes and in Liposomes. *Biophysical Journal* **82**: 1418-1428
- Nagao E, Arie T, Dorward DW, Fairhurst RM, Dvorak JA (2008) The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. *Journal of structural biology* **162**: 460-467
- Nagao E, Kaneko O, Dvorak JA (2000) *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes: Qualitative and Quantitative Analyses of Parasite-Induced Knobs by Atomic Force Microscopy. *Journal of structural biology* **130**: 34-44
- Nazarenko Y, Han TW, Liroy PJ, Mainelis G (2011) Potential for exposure to engineered nanoparticles from nanotechnology-based consumer spray products. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* **21**: 515-528

Nazarenko Y, Zhen H, Han T, Liyo PJ, Mainelis G (2012) Potential for inhalation exposure to engineered nanoparticles from nanotechnology-based cosmetic powders. *Environmental Health Perspectives* **120**: 885-892

Ncokazi KK, Egan TJ (2005) A colorimetric high-throughput β -hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Analytical biochemistry* **338**: 306-319

Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* **8**: 543-557

Nessler F, Boize M, Bottero J, Chevalier D, Gaffet E, Bihan O, Mouneyrac C, Riediker M, Tardif F (2010) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. *Rapport d'expertise collective de l'AFSSET*

Nielsen LK, Balashev K, Callisen TH, Bjørnholm T (2002) Influence of Product Phase Separation on Phospholipase A2 Hydrolysis of Supported Phospholipid Bilayers Studied by Force Microscopy. *Biophysical Journal* **83**: 2617-2624

Nielsen MMB, Simonsen AC (2013) Imaging Ellipsometry of Spin-Coated Membranes: Mapping of Multilamellar Films, Hydrated Membranes, and Fluid Domains. *Langmuir* **29**: 1525-1532

Nielsen S, Otzen D (2013) Quartz Crystal Microbalances as Tools for Probing Protein-Membrane Interactions. In *Lipid-Protein Interactions*, Kleinschmidt JH (ed), Vol. 974, 1, pp 1-21. Humana Press

Ninomiya K, Noda K, Ogino C, Kuroda S-i, Shimizu N (2014) Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO₂ nanoparticles: its application to targeted sonodynamic therapy. *Ultrasonics Sonochemistry* **21**: 289-294

Ninomiya K, Ogino C, Oshima S, Sonoke S, Kuroda S-i, Shimizu N (2012) Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO₂ nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry* **19**: 607-614

Nussio MR, Oncins G, Ridelis I, Szili E, Shapter JG, Sanz F, Voelcker NH (2009) Nanomechanical characterization of phospholipid bilayer islands on flat and porous substrates: a force spectroscopy study. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**: 10339-10347

Oberdörster G (2000) Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *International archives of occupational and environmental health* **74**: 1-8

Oesterhelt F, Scheuring S (2006) High-resolution imaging and force measurement of individual membrane proteins by AFM. *Current Nanoscience* **2**: 329-335

Olson F, Hunt C, Szoka F, Vail W, Papahadjopoulos D (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **557**: 9-23

Omodeo-Salè F, Monti D, Olliaro P, Taramelli D (2001) Prooxidant activity of β -hematin (synthetic malaria pigment) in arachidonic acid micelles and phospholipid large unilamellar vesicles. *Biochemical Pharmacology* **61**: 999-1009

Ostiguy C, Larberge B, Woods C, Soucy B (2010) Les nanoparticules de synthèse - Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. *IRSST* 2e edition

Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK (2000) The structure of malaria pigment β -haematin. *Nature* **404**: 307-310

Palacpac NMQ, Hiramane Y, Mi-ichi F, Torii M, Kita K, Hiramatsu R, Horii T, Mitamura T (2004) Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Journal of Cell Science* **117**: 1469-1480

Parapini S, Basilico N, Pasini E, Egan TJ, Olliaro P, Taramelli D, Monti D (2000) Standardization of the Physicochemical Parameters to Assess *in Vitro* the β -Hematin Inhibitory Activity of Antimalarial Drugs. *Experimental parasitology* **96**: 249-256

Parasassi T, De Stasio G, d'Ubaldo A, Gratton E (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* **57**: 1179-1186

Parasassi T, De Stasio G, Ravagnan G, Rusch R, Gratton E (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* **60**: 179-189

Parasassi T, Gratton E (1995) Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *Journal of Fluorescence* **5**: 59-69

Parasassi T, Krasnowska EK, Bagatolli L, Gratton E (1998) Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *Journal of Fluorescence* **8**: 365-373

-
- Parasassi T, Loiero M, Raimondi M, Ravagnan G, Gratton E (1993) Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1153**: 143-154
- Parimi S, Barnes TJ, Prestidge CA (2008) PAMAM dendrimer interactions with supported lipid bilayers: a kinetic and mechanistic investigation. *Langmuir* **24**: 13532-13539
- Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P (2007) Nanosize and Vitality: TiO₂ Nanotube Diameter Directs Cell Fate. *Nano letters* **7**: 1686-1691
- Peetla C, Stine A, Labhasetwar V (2009) Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Molecular pharmaceuticals* **6**: 1264-1276
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature cell biology* **3**: 473-483
- Peng L, Stephens BJ, Bonin K, Cubicciotti R, Guthold M (2007) A combined atomic force/fluorescence microscopy technique to select aptamers in a single cycle from a small pool of random oligonucleotides. *Microscopy research and technique* **70**: 372-381
- Pera I, Stark R, Kappl M, Butt H-J, Benfenati F (2004) Using the atomic force microscope to study the interaction between two solid supported lipid bilayers and the influence of synapsin I. *Biophysical Journal* **87**: 2446-2455
- Perez-Gil J, Weaver TE (2010) Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology* **25**: 132-141
- Picas L, Milhiet P-E, Hernández-Borrell J (2012) Atomic force microscopy: A versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chemistry and physics of lipids* **165**: 845-860
- Pifer PM, Yates EA, Legleiter J (2011) Point mutations in A β result in the formation of distinct polymorphic aggregates in the presence of lipid bilayers. *PLoS one* **6**: e16248
- Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research* **47**: 1597-1598
- Postle AD, Heeley EL, Wilton DC (2001) A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **129**: 65-73

-
- Puddu V, Choi H, Dionysiou DD, Puma GL (2010) TiO₂ photocatalyst for indoor air remediation: Influence of crystallinity, crystal phase, and UV radiation intensity on trichloroethylene degradation. *Applied Catalysis B: Environmental* **94**: 211-218
- Puntheeranurak T, Neundlinger I, Kinne RK, Hinterdorfer P (2011) Single-molecule recognition force spectroscopy of transmembrane transporters on living cells. *Nature Protocols* **6**: 1443-1452
- Puu G, Gustafson I (1997) Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes—factors of importance for kinetics and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1327**: 149-161
- Radmacher M, Tillmann R, Fritz M, Gaub H (1992) From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science* **257**: 1900-1905
- Rancan F, Gao Q, Graf C, Troppens S, Hadam S, Hackbarth S, Kembuan C, Blume-Peytavi U, Rühl E, Lademann Jr (2012) Skin Penetration and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles with Variable Size, Surface Functionalization, and Colloidal Stability. *ACS nano* **6**: 6829-6842
- Reiter R, Motschmann H, Knoll W (1993) Ellipsometric characterization of streptavidin binding to biotin-functionalized lipid monolayers at the water/air interface. *Langmuir* **9**: 2430-2435
- Reviakine I, Brisson A (2000) Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* **16**: 1806-1815
- Richter RP, Bérat R, Brisson AR (2006) Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir* **22**: 3497-3505
- Richter RP, Brisson A (2003) Characterization of lipid bilayers and protein assemblies supported on rough surfaces by atomic force microscopy. *Langmuir* **19**: 1632-1640
- Richter RP, Brisson AR (2005) Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophysical Journal* **88**: 3422-3433
- Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE (1999) Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nature Structural & Molecular Biology* **6**: 346-349
- Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**: 1109-1112

-
- Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H (2009) Nanomedicine—challenge and perspectives. *Angewandte Chemie International Edition* **48**: 872-897
- Rinia HA, Demel RA, van der Eerden J, de Kruijff B (1999) Blistering of langmuir-blodgett bilayers containing anionic phospholipids as observed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **77**: 1683-1693
- Rinia HA, Snel MM, van der Eerden JP, de Kruijff B (2001) Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS letters* **501**: 92-96
- Rodriguez N, Pincet F, Cribier S (2005) Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **42**: 125-130
- Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S (2008) Interaction of nanoparticles with lipid membrane. *Nano letters* **8**: 941-944
- Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S (2009) Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces. *Langmuir* **25**: 6287-6299
- Rossi C, Chopineau J (2007) Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies. *Eur Biophys J* **36**: 955-965
- Rothman JE, Lenard J (1977) Membrane asymmetry. *Science* **195**: 743-753
- Sachan AK, Harishchandra RK, Bantz C, Maskos M, Reichelt R, Galla H-J (2012) High-resolution investigation of nanoparticle interaction with a model pulmonary surfactant monolayer. *ACS nano* **6**: 1677-1687
- Sager TM, Porter DW, Robinson VA, Lindsley WG, Schwegler-Berry DE, Castranova V (2007) Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology* **1**: 118-129
- Samuel BU, Mohandas N, Harrison T, McManus H, Rosse W, Reid M, Haldar K (2001) The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 29319-29329

Saner M, Stoklosa A (2013) Commercial, Societal and Administrative Benefits from the Analysis and Clarification of Definitions: The Case of Nanomaterials. *Creativity and Innovation Management* **22**: 26-36

Santhosh P, Penič S, Genova J, Iglič A, Kralj-Iglič V, Ulrih N (2012) A study on the interaction of nanoparticles with lipid membranes and their influence on membrane fluidity. In *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 398, p 012034.

Santos NC, Ter-Ovanesyan E, Zasadzinski JA, Prieto M, Castanho MA (1998) Filipin-induced lesions in planar phospholipid bilayers imaged by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **75**: 1869-1873

Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL (2006) Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* **92**: 174-185

Schleh C, Muhlfield C, Pulskamp K, Schmiedl A, Nassimi M, Lauenstein HD, Braun A, Krug N, Erpenbeck VJ, Hohlfield JM (2009) The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure. *Respir Res* **10**: 90

Schneider J, Barger W, Lee GU (2003) Nanometer scale surface properties of supported lipid bilayers measured with hydrophobic and hydrophilic atomic force microscope probes. *Langmuir* **19**: 1899-1907

Schuck S, Simons K (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *Journal of Cell Science* **117**: 5955-5964

Seantier B, Kasemo B (2009) Influence of mono-and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption. *Langmuir* **25**: 5767-5772

Seeger HM, Cerbo AD, Alessandrini A, Facci P (2010) Supported Lipid Bilayers on Mica and Silicon Oxide: Comparison of the Main Phase Transition Behavior. *The Journal of Physical Chemistry B* **114**: 8926-8933

Seeger HM, Marino G, Alessandrini A, Facci P (2009) Effect of Physical Parameters on the Main Phase Transition of Supported Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **97**: 1067-1076

Seelig J, Gally H-U, Wohlgemuth R (1977) Orientation and flexibility of the choline head group in phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **467**: 109-119

-
- Sherman IW, Eda S, Winograd E (2003) Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes and Infection* **5**: 897-909
- Shimshick EJ, McConnell HM (1973) Lateral phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry* **12**: 2351-2360
- Silin VI, Wieder H, Woodward JT, Valincius G, Offenhausser A, Plant AL (2002) The role of surface free energy on the formation of hybrid bilayer membranes. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 14676-14683
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572
- Simons K, Sampaio JL (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: 1-17
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* **1**: 31-39
- Simons K, Van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**: 6197-6202
- Simonsen AC, Bagatolli LA (2004) Structure of spin-coated lipid films and domain formation in supported membranes formed by hydration. *Langmuir* **20**: 9720-9728
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731
- Sipe JD, Cohen AS (2000) Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology* **130**: 88-98
- Somerharju P, Virtanen JA, Cheng KH (1999) Lateral organisation of membrane lipids: The superlattice view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1440**: 32-48
- Steltenkamp S, Müller MM, Deserno M, Hennesthal C, Steinem C, Janshoff A (2006) Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **91**: 217-226
- Stern ST, McNeil SE (2008) Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicological sciences* **101**: 4-21

REFERENCES

- Stewart JCM (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical biochemistry* **104**: 10-14
- Subirade M, Salesse C, Marion D, Pezolet M (1995) Interaction of a nonspecific wheat lipid transfer protein with phospholipid monolayers imaged by fluorescence microscopy and studied by infrared spectroscopy. *Biophysical Journal* **69**: 974-988
- Suresh S, Edwardson JM (2010) Phase separation in lipid bilayers triggered by low pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **399**: 571-574
- Talbott CM, Vorobyov I, Borchman D, Taylor KG, DuPré DB, Yappert MC (2000) Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1467**: 326-337
- Tamm LK, McConnell HM (1985) Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* **47**: 105-113
- Tanaka M, Sackmann E (2005) Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* **437**: 656-663
- Tatur S, Badia A (2011) Influence of hydrophobic alkylated gold nanoparticles on the phase behavior of monolayers of DPPC and clinical lung surfactant. *Langmuir* **28**: 628-639
- Theumer MG, Clop EM, Rubinstein HR, Perillo MA (2008) The lipid-mediated hypothesis of fumonisin B1 toxicodynamics tested in model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **64**: 22-33
- Thevenot P, Cho J, Wavhal D, Timmons RB, Tang L (2008) Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **4**: 226-236
- Tierney R, Hermina W, Walsh S (2013) The pharmaceutical technology landscape: A new form of technology roadmapping. *Technological Forecasting and Social Change* **80**: 194-211
- Tokumasu F, Jin AJ, Feigenson GW, Dvorak JA (2003) Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy* **97**: 217-227
- Toshniwal PK, Zarling EJ (1992) Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochemical research* **17**: 205-207

-
- Urban C, Schurtenberger P (1998) Dynamic light scattering in turbid suspensions: an application of different cross-correlation experiments. In *Trends in Colloid and Interface Science XII*, pp 61-65. Springer
- Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Schanck A, Brasseur R, Tulkens PM (1993) Alterations in membrane permeability induced by aminoglycoside antibiotics: studies on liposomes and cultured cells. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* **247**: 155-168
- van Meer G (2005) Cellular lipidomics. *The EMBO Journal* **24**: 3159-3165
- van Schalkwyk DA, Saliba KJ, Biagini GA, Bray PG, Kirk K (2013) Loss of pH Control in Plasmodium falciparum Parasites Subjected to Oxidative Stress. *PloS one* **8**: e58933
- Vauthier C, Couvreur P, Fattal E (2013) Nanomaterials: Applications in Drug Delivery. In *Nanomaterials: A Danger or a Promise?*, pp 131-151. Springer
- Villiers K, Kaschula C, Egan T, Marques H (2007) Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not μ -oxo dimer formation. *J Biol Inorg Chem* **12**: 101-117
- Wacklin HP (2011) Composition and Asymmetry in Supported Membranes Formed by Vesicle Fusion. *Langmuir* **27**: 7698-7707
- Wacklin HP, Thomas RK (2007) Spontaneous formation of asymmetric lipid bilayers by adsorption of vesicles. *Langmuir* **23**: 7644-7651
- Wagner K, Brezesinski G (2007) Phospholipase D activity is regulated by product segregation and the structure formation of phosphatidic acid within model membranes. *Biophysical Journal* **93**: 2373-2383
- Wang B, Zhang L, Bae SC, Granick S (2008) Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 18171-18175
- Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM (2007) Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology letters* **171**: 99-110
- Warheit DB, Sayes CM, Reed KL, Swain KA (2008) Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacology and Therapeutics* **120**: 35

Weber G, Farris FJ (1979) Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene. *Biochemistry* **18**: 3075-3078

Weerachatanukul W, Proboadh I, Kongmanas K, Tanphaichitr N, Johnston LJ (2007) Visualizing the localization of sulfoglycolipids in lipid raft domains in model membranes and sperm membrane extracts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1768**: 299-310

Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N (2012) Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science & Technology* **46**: 2242-2250

Wesołowska O, Michalak K, Maniewska J, Hendrich AB (2009) Giant unilamellar vesicles-a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim Pol* **56**: 33-39

Westerhausen C, Strobl F, Herrmann R, Bauer A, Schneider S, Reller A, Wixforth A, Schneider M (2012) Chemical and mechanical impact of silica nanoparticles on the phase transition behavior of phospholipid membranes in theory and experiment. *Biophysical Journal* **102**: 1032-1038

Wu H, Yu L, Tong Y, Ge A, Yau S, Osawa M, Ye S (2013) Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of the Supported Phospholipid Bilayers Studied by Atomic Force Microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1828**: 642-651

Wu Z, Lee D, Rubner MF, Cohen RE (2007) Structural Color in Porous, Superhydrophilic, and Self-Cleaning SiO₂/TiO₂ Bragg Stacks. *Small* **3**: 1445-1451

Xia Y, Zhang F, Xie H, Gu N (2008) Nanoparticle-reinforced resin-based dental composites. *Journal of dentistry* **36**: 450-455

Yang X, Zhang X, Ma Y, Huang Y, Wang Y, Chen Y (2009) Superparamagnetic graphene oxide-Fe₃O₄ nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers. *Journal of Materials Chemistry* **19**: 2710-2714

Zhang H, Shih J, Zhu J, Kotov NA (2012a) Layered Nanocomposites from Gold Nanoparticles for Neural Prosthetic Devices. *Nano letters* **12**: 3391-3398

Zhang S, Nelson A, Beales PA (2012b) Freezing or Wrapping: The Role of Particle Size in the Mechanism of Nanoparticle-Biomembrane Interaction. *Langmuir* **28**: 12831-12837

Valorisations scientifiques

Articles scientifiques

S. Morandat, S. Azouzi, **E. Beauvais**, A. Mastouri, K. El Kirat. Atomic Force Microscopy of model membranes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. 405 :1445-1461

E. Beauvais, S. Morandat, S. Azouzi, K. El Kirat. The size and shape of gel phase domains in supported lipid membranes can be tuned by changing the fusion temperature. *Colloids and surfaces B : Biointerfaces*. En finalisation

S. Azouzi, **E. Beauvais**, K. El Kirat, S. Morandat. The membranotropic activity of hematin is inhibited by the formation of the malarial pigment. *Biochemical Pharmacology*. En finalisation

Posters

E. Beauvais, K. El Kirat, S. Morandat. The size and shape of gel phase domains in supported lipid membranes can be tuned by changing the fusion temperature. *AFM BioMed 2011*. 23-27 août 2011, Paris, France

E. Beauvais, S. Azouzi, K. El Kirat, S. Morandat. Nanoscale investigation of the early steps of Malaria pigment formation provoked by the interaction of hemin within supported lipid membranes. *AFM BioMed 2011*. 23-27 août 2011, Paris, France

S. Azouzi, **E. Beauvais**, A. Mastouri, O. Fadel, M. Besse, K. El Kirat, S. Morandat. Penetration and organization of alamethicin in lipid membranes: influence of sphingomyelin and cholesterol. *AFM BioMed 2011*. 23-27 août 2011, Paris, France

Communications orales

E. Beauvais, S. Azouzi, S. Morandat, K. El Kirat. Nanoscale investigation of the early steps of Malaria pigment formation provoked by the interaction of hematin with lipid membranes. *GEM XV*. 2-4 avril 2012, Paris, France