



Incorporation de protéines membranaires produites par un système d'expression protéique acellulaire dans des bicouches lipidiques planes

Angélique Coutable

► To cite this version:

Angélique Coutable. Incorporation de protéines membranaires produites par un système d'expression protéique acellulaire dans des bicouches lipidiques planes. Biologie cellulaire. INSA de Toulouse, 2014. Français. NNT : 2014ISAT0042 . tel-01250676

HAL Id: tel-01250676

<https://theses.hal.science/tel-01250676>

Submitted on 5 Jan 2016

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ingénierie microbienne et enzymatique

Présentée et soutenue par :

Angélique COUTABLE

le : vendredi 14 mars 2014

Titre :

Incorporation de protéines membranaires produites par un système
d'expression protéique acellulaire dans des bicouches lipidiques planes

JURY

Pr Christophe VIEU, Président
Pr Jean-Luc LENORMAND, Examineur
Dr Pierre-Emmanuel MILHIET, Rapporteur
Dr Olivier FRANCAIS, Rapporteur
Dr Emmanuelle TREVISIOL, Invitée

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

LISBP-INSa Toulouse & LAAS-CNRS

Directeur(s) de Thèse :

Pr Jean-Marie FRANCOIS
Dr Christophe THIBAULT

Rapporteurs :

Dr Pierre-Emmanuel MILHIET
Dr Olivier FRANCAIS

Remerciements

Avant de clôturer cette belle et inoubliable expérience que fut ma thèse et de partir vers de nouveaux horizons, je tiens à remercier tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à sa réussite.

Cette thèse pluridisciplinaire fut réalisée en collaboration entre deux laboratoires toulousains : le LISBP et le LAAS-CNRS. Je tiens donc à remercier le directeur du LISBP, Nic Lindley, et le directeur du LAAS-CNRS, Jean Arlat, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires. Je n'oublie pas l'ITAV (Institut des Technologies Avancées du Vivant), qui m'a permis d'utiliser la QCM-D, un outil indispensable de ce travail de thèse.

Je ne peux pas continuer sans remercier mon directeur de thèse, Jean-Marie François de m'avoir fait confiance en me donnant l'opportunité d'effectuer cette thèse. Merci de son soutien dans les moments plus difficiles de la thèse tels que la rédaction d'article mais également la rédaction de la thèse dont les précieux conseils m'ont permis d'améliorer ce manuscrit. Dans cette thèse pluridisciplinaire, outre un biologiste, j'ai eu pour co-directeur de thèse Christophe Thibault que je remercie pour son accueil et la liberté de recherche qu'il m'a laissé au sein de l'équipe NBS du LAAS dont il est le nouveau responsable. Je tiens également à remercier Emmanuelle Trévisiol qui a été à mes côtés tout le long de ces 3 années de thèse tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour son aide et ses conseils précieux dans le domaine de la chimie de surface et l'analyse des résultats.

Je tiens à remercier pour leur aide et leurs précieux conseils la plateforme technologique TEAM du LAAS-CNRS et en particulier Franck Carcenac ainsi que Charline et Sandrine du service I2C, Marie-Ange Teste et Jean-Luc Parrou du LISBP, Renaud Pointcloux de l'IPBS. Je remercie aussi les ingénieurs plateforme de l'ITAV : Childéric Séverac de la plateforme BioNanoTechnologies, Jacques Rouquette de la plateforme Imagerie pour les formations microscopes sans oublier Mathieu Danel de la plateforme Chimie.

Je remercie également les collaborateurs de ce projet : l'équipe de Vincent Noireaux qui nous a fourni le système d'expression protéique acellulaire, l'équipe de Simon Scheuring pour les expériences de Microscopie à Force Atomique de Haute Résolution et l'équipe de Bruno Lepioufle pour les expériences de conductivité ionique.

Une thèse n'est pas seulement une expérience professionnelle c'est aussi l'occasion de rencontrer des personnes exceptionnelles avec qui des liens peuvent se créer. Je remercie Jérôme Chalmeau dont j'ai pris la suite de la thèse et qui m'a transmis les connaissances acquises durant ses travaux de recherche. Merci également à tous mes collègues passés (Amélie, Amandine, Aline, Florent, Jonathan, ...) et présents (Julie Fr., Julie F., Laurène, Aude, Raphaël, Pattamon, Denis, Carlos, Cécile, ...).

Je n'oublie pas mes amis qui m'ont soutenu durant toutes ces années, ma famille qui a cru en moi durant ces longues années d'études. Et... un grand ou plutôt un énorme merci à Pierre, pour ses conseils pertinents et son soutien inconditionnel.

Et pour finir, je remercie toutes les personnes que j'aurais pu oublier de citer ...

Sommaire

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Avant-propos	7
Partie I : Etat de l'Art, des membranes biologiques aux membranes biomimétiques intégrant des protéines membranaires	9
1. Contexte	10
2. La membrane biologique	10
2.1. Généralités	10
2.2. Les lipides	14
2.3. Les protéines membranaires.....	17
3. Des membranes biologiques aux modèles membranaires	23
3.1. Généralités	23
3.2. Les liposomes	23
3.3. Les membranes planes	27
4. Reconstitution des protéines	54
4.1. Production classique de protéines recombinantes	54
4.2. Système d'expression acellulaire	55
4.3. Intégration des protéines produites par CFPS dans des systèmes liposomes	62
5. Positionnement des travaux.....	68
6. Références	70
Partie II : Matériel et Méthodes	77
1. Préparation des plasmides	78
1.1. Souches et plasmides	78
1.2. Amplification plasmidique.....	81
1.3. Extraction plasmidique.....	82
1.4. Vérification de la taille des ADN plasmidiques.....	83
1.5. Détermination de la masse molaire des solutions plasmidiques	84
2. Expression de protéines <i>in vitro</i>	85
2.1. Extrait cellulaire utilisé	85
2.2. Préparation PGA	85
2.3. Préparation AA	86

2.4.	Préparation du système d'expression protéique acellulaire.....	87
2.5.	Vérification de la production de protéines	87
3.	Préparation des solutions de liposomes.....	88
3.1.	Lipides.....	88
3.2.	Tampons utilisés pour la préparation des suspensions de liposomes	90
3.3.	Préparation des solutions lipidiques	90
3.4.	Préparation des liposomes.....	90
3.5.	Caractérisation de la taille des liposomes	93
4.	Formation d'une bicouche lipidique et incorporation de protéines produites par le système d'expression protéique acellulaire (CFPS)	95
4.1.	Tampons utilisés.....	95
4.2.	Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par QCM-D.....	95
4.3.	Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par SPR.....	99
4.4.	Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par FRAP	101
4.5.	Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par AFM	103
5.	Références	108
Partie III : Résultats et Discussion		109
Chapitre 1 : Incorporation de pores membranaires dans une bicouche phospholipidique supportée (SLB).....		110
Remarques générales.....		111
1.	Stratégie de construction de la membrane	112
1.1.	Caractérisation de la formation de membrane par QCM-D.....	112
1.2.	Caractérisation de la formation d'une SLB par FRAP	114
1.3.	Caractérisation de la formation d'une SLB par AFM	117
1.4.	Formation d'une SLB : conclusion	118
2.	Insertion de pores membranaires dans une bicouche lipidique supportée (SLB)	118
2.1.	Choix de l'Alpha Hémolysine et de l'Alpha Hémolysine-eGFP	118
2.2.	Production et incorporation de protéines membranaires	119
2.3.	Optimisation des paramètres du CFPS.....	125
3.	Conclusion générale	128
4.	Références	129
Chapitre 2 : Incorporation de protéines membranaires dans une bicouche lipidique espacées et ancrées (tBLMs).....		131
1.	Formation de tBLMs sur surface de SiO ₂	132
1.1.	Stratégie de formation de tBLM avec l'espaceur PEG-OCH ₃ sur SiO ₂	133

1.2.	Formation d'une tBLM avec un espaceur PEG-NH ₂	138
1.3.	Conclusion	144
2.	Formation de tBLM sur or et incorporation d'AqpZ.....	145
2.1.	Adsorption des molécules DSPE-PEG(2000)PDP sur surface d'or.....	145
2.2.	Utilisation d'une molécule facilitant la fusion lipidique : l'alpha peptide.....	146
2.3.	Incorporation de l'Aquaporine Z	153
2.4.	Optimisation du ratio molaire de la tBLM et incorporation d'AqpZ	155
3.	Conclusion.....	162
4.	Références	163
Chapitre 3 : Mise au point d'une membrane biomimétique		164
1.	Formation d'une bicouche lipidique supportée (SLB) biomimétique	165
1.1.	Effet de la concentration en calcium sur la formation de SLB composée de lipides totaux extraits d' <i>E.coli</i>	165
1.2.	Recherche des conditions pour former une SLB biomimétique complète	170
1.3.	Effet de la composition lipidique de la SLB sur la production de l'alpha hémolysine-eGFP.	176
2.	Formation d'une tBLM biomimétique et son impact sur la production d'Aquaporine Z	179
2.1.	Formation d'une tBLM biomimétique.....	179
2.2.	Incorporation d'Aquaporine Z.....	181
3.	Conclusion.....	185
4.	Références	186
Chapitre 4 : Etude de la fonctionnalité des protéines membranaires.....		187
1.	Mesures de conductance: système expérimental.....	189
1.1.	Le système expérimental.....	189
1.2.	Formation de la bicouche suivie de l'incorporation de protéines.	190
2.	Mesure de la conductance de canaux ioniques : résultats	191
3.	Conclusion.....	193
4.	Références	194
Bilan et perspectives.....		195
Annexes.....		199
A.	Annexe 1 : La mesure d'angle de contact	200
B.	Annexe 2 : Contributions scientifiques	202
Résumé / Abstract.....		203

Liste des abréviations

AFM : microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*)

AH : alpha hémolysine

AH-eGFP : alpha hémolysine-eGFP

AqpZ : aquaporine Z

CFPS : système d'expression protéique acellulaire

CFPS « témoin » : système d'expression protéique acellulaire ne comportant pas le plasmide porteur du gène codant pour une protéine d'intérêt

CFPS « AH » : système d'expression protéique acellulaire comportant le plasmide porteur du gène codant pour la protéine alpha hémolysine

CFPS « AqpZ » : système d'expression protéique acellulaire comportant le plasmide porteur du gène codant pour la protéine aquaporine Z

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

DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane

DPG : diphosphatidylglycérol

DSPE-PEG(2000)PDP : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[PDP(polyethylene glycol)-2000]

FRAP : Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence Recovery after photobleaching*)

GUV : vésicules géantes unilamellaires (*giant unilamellar vesicle*)

ITO : oxyde d'indium dopé à l'étain

LUV : large unilamellar vesicle (larges vésicules unilamellaires)

MLV : multilamellar lipid vesicle

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

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG-OCH₃ : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]

PEG-NH₂ : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]

PI : phosphatidylinositol

PG : phosphatidylglycérol

PS : phosphatidylsérine

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

QCM-D : microbalance à quartz et à dissipation (*Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring*)

RCIM : microscopie à contraste interférentiel en réflexion

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

SPR : Résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance*)

SUV : petites vésicules unilamellaires (*small unilamellar vesicle*)

tBLM : bicouches lipidiques espacées et ancrées (*tethered Bilayer Lipid Membrane*)

TiO₂ : dioxyde de titane

Avant-propos

De tout temps, les hommes ont cherché à comprendre d'où provenaient les maladies dans le but de trouver des traitements curatifs. Ceci a amené les chercheurs à appréhender les processus de l'échelle humaine à l'échelle nanométrique grâce aux nombreuses découvertes qui se sont succédées depuis la découverte de la cellule au XVII^{ème} siècle. L'une des découvertes fondamentales est celle au milieu du XIX^{ème} siècle par le chimiste Gerardus Johannes Mulder de macromolécules complexes appelées « protéines ». Les protéines sont des molécules biologiques composées d'une ou de plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Ce sont des éléments essentiels à la vie cellulaire, assurant la majorité des fonctions cellulaires (rôle structural, rôle de mobilité, ...). Elles sont classées en trois catégories : les protéines solubles, les protéines membranaires périphériques (ou extrinsèques) et les protéines membranaires intégrales (ou intrinsèques). Afin de les identifier, de déterminer leur structure et d'étudier leur fonction mais également pour trouver des molécules capables de les bloquer à des fins thérapeutiques (dans le cas du « drug design ») de nombreuses méthodes biophysiques (spectroscopie RMN, cristallographie par rayons X, ..) et biochimiques (électrophorèse sur gel) peuvent être utilisées. L'étude à l'échelle protéique requiert la production de ces protéines *in vitro*. Celle des protéines membranaires intégrales est plus complexe et est dépendante de plusieurs composantes. D'une part, elles doivent être produites dans des cellules eucaryotes ou procaryotes. Néanmoins, leur production est parfois limitée par des problèmes de toxicité cellulaire mais peut également être limitée par leur structure complexe (faible rendement, agrégation protéique, mauvais repliement). Afin de limiter les problèmes de toxicité cellulaire ou de limitation de production de ces protéines, une alternative a été développée depuis une vingtaine d'années. Il s'agit des systèmes d'expression protéiques acellulaires basés sur l'utilisation d'extraits acellulaires.

Notre travail s'inscrit dans la démarche d'intégrer des protéines membranaires intégrales dans un environnement propice afin qu'elles puissent être produites dans leur bonne conformation, l'objectif ultime étant de créer un biodétecteur utilisable pour l'analyse fonctionnelle des protéines et la mise au point de traitements thérapeutiques (« drug delivery »).

Le manuscrit de thèse est organisé en trois parties. Dans une première partie, nous décrirons l'état de l'art retraçant les notions de membrane biologique, de lipides et de protéines nécessaires à la compréhension des travaux réalisés dans cette thèse. Nous y

retracerons également les différents types de membranes « modèles » développées à ce jour ainsi que les différentes façons de produire des protéines membranaires. Dans une deuxième partie, je présenterai les techniques utilisées ainsi que les protocoles mis au point dans le cadre de cette étude. Les résultats obtenus au cours de ces travaux seront développés dans une troisième partie au travers de quatre chapitres. Dans le premier chapitre, l'incorporation de protéines membranaires dans une bicouche lipidique supportée (SLB) ainsi que l'optimisation des paramètres d'incorporation seront explicités. Dans le second chapitre, je montrerai qu'une bicouche lipidique espacée et ancrée (BLM) peut être mise au point par un procédé de fusion lipidique pour permettre l'incorporation de protéines membranaires. Dans un troisième chapitre, une comparaison dans l'incorporation de protéines membranaires dans des bicouches lipidiques purement synthétiques ou biomimétiques (c'est-à-dire proches de par leur composition des bicouches lipidiques de cellules vivantes) sera décrite et discutée. Enfin, dans un quatrième et dernier chapitre, j'aborderai la question de la fonctionnalité des protéines membranaires étudiées.

***Partie I : Etat de l'Art, des membranes
biologiques aux membranes biomimétiques
intégrant des protéines membranaires***

1. Contexte

L'objectif général de cette partie est de situer notre problématique d'étude, à savoir la mise au point de l'insertion de protéines membranaires intégrales produites par un système d'expression protéique acellulaire dans une membrane biomimétique. Pour cela, je présenterai une étude bibliographique sur les membranes biologiques dont l'importance croissante en biotechnologie médicale a amené à la mise au point de différents types de membranes lipidiques biomimétiques. Je m'intéresserai ensuite plus en détail à un composant essentiel des membranes biologiques, les protéines membranaires. Deux protéines l'alpha-hémolysine (AH) et l'aquaporine Z (AqpZ) utilisées dans le cadre de nos travaux seront décrites plus en détail. Nous verrons comment ces protéines, généralement produites de façon classique, peuvent être aussi produites en utilisant un système d'expression protéique acellulaire. J'aborderai ensuite les avantages de ces systèmes qui peuvent être couplés à des molécules lipidiques. Enfin, dans une dernière partie, le positionnement de nos travaux dans ce contexte d'état de l'art sera exposé.

2. La membrane biologique

2.1. Généralités

2.1.1. *Historique*

Les premiers travaux s'intéressant aux membranes biologiques datent de la fin du XIX^{ème} siècle. La structure des membranes cellulaires en bicouches lipidiques a été mise en évidence en 1925 par Gorter et Grendl¹. En 1935, Danielli et Davson², grâce à des données thermodynamiques, ont postulé que des protéines globulaires se trouveraient sur la surface externe de la membrane lipidique, par mesure de la tension de surface et de la perméabilité. Cette découverte a été étendue aux organelles par Robertson³ (Figure 1).

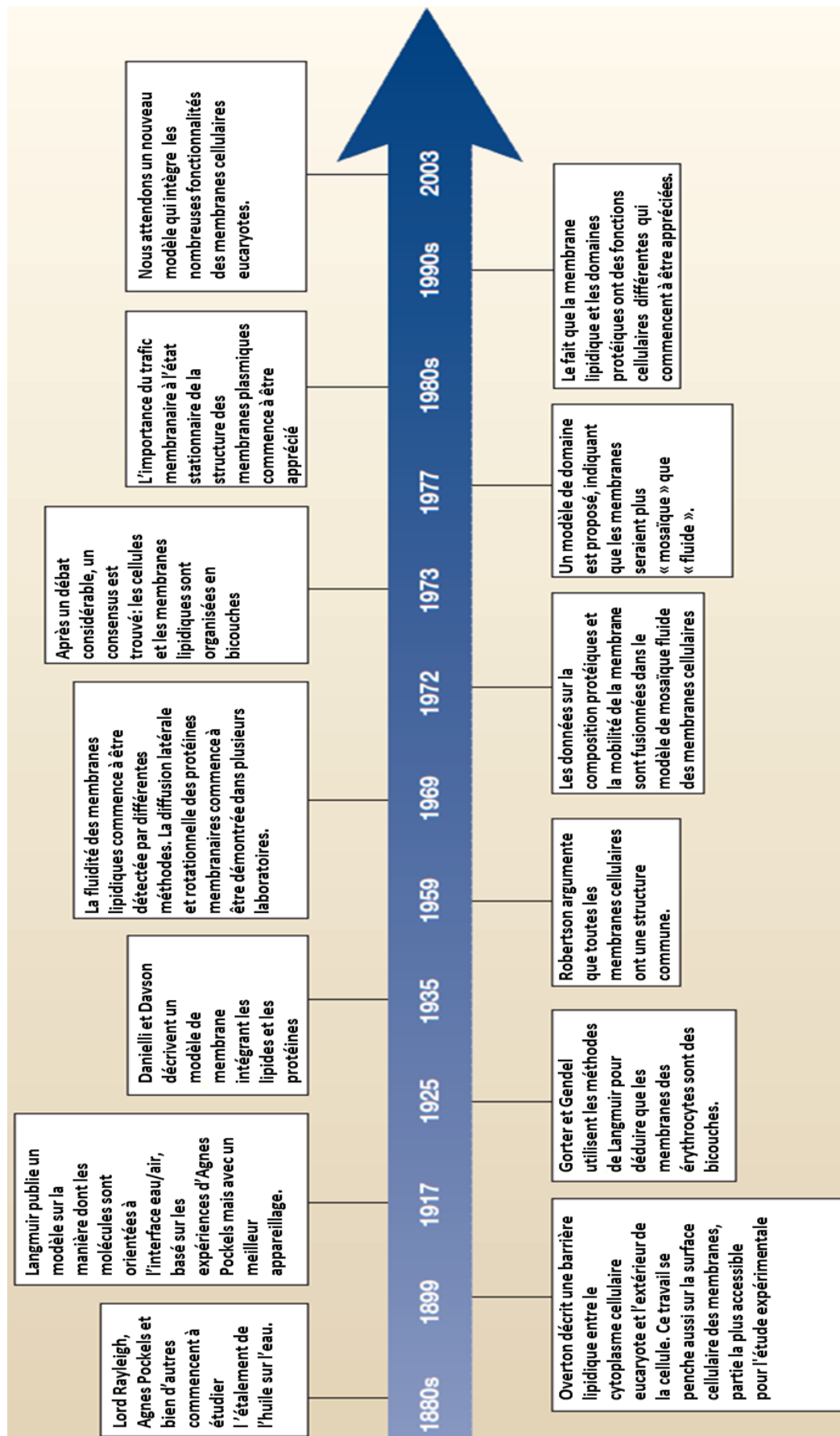


Figure 1 : Chronologie des études et découvertes sur les membranes d'après Edidin⁴.

Grâce aux connaissances acquises sur les protéines membranaires, Singer et Nicholson⁵ en 1972, ont émis l'hypothèse que les membranes biologiques pouvaient être décrites selon le modèle de la mosaïque fluide (Figure 2). Cette hypothèse, communément admise, a été enrichie par la mise en évidence de la distribution asymétrique des lipides entre les deux feuillets de la membrane⁴.

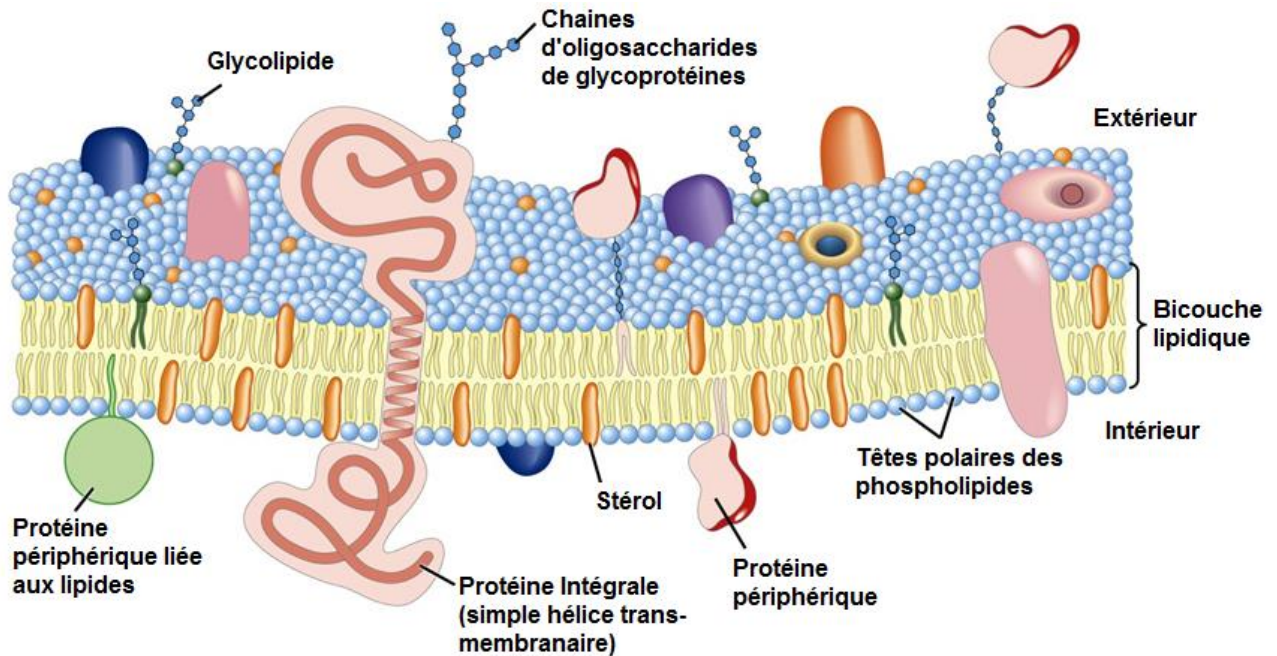


Figure 2 : Représentation schématique d'une membrane lipidique⁶.

2.1.2. Structure de la membrane biologique

Les membranes biologiques sont composées de deux types de constituants principaux : les lipides et les protéines. Des résidus osidiques (ou carbohydrates) sont également présents. Ces résidus osidiques ne sont pas à proprement parler des constituants membranaires, ils sont toujours associés aux lipides et aux protéines sous forme de glycolipides ou de glycoprotéines.

La diversité des membranes étant très grande, les compositions lipidiques diffèrent selon les organismes comme l'indique le Tableau 1. La variabilité peut être due à la diversité lipidique, certaines membranes pouvant être constituées d'une seule famille lipidique alors que pour d'autres plusieurs classes sont requises. Nous pouvons citer par exemple, la membrane cytoplasmique d'*E.coli* qui en terme de composition lipidique n'est constituée que d'une seule classe lipidique, les phospholipides. La diversité de composition membranaire peut également être due au ratio protéines/lipides présents dans la membrane. Certains systèmes biologiques ont une composition majoritaire en protéines comme *E. coli*, d'autres en lipides comme c'est le cas pour la myéline (Tableau 1)⁷.

	Myéline	Erythrocyte	Mitochondrie	E. coli	Chloroplaste
Lipide/ Protéine (en poids)	3 : 1	1 : 3	1 : 3	1 : 3	1 : 1
Phospholipide (%)	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	
Glycolipide (%)					80
dont MGDG					41
DGDG					23
SQDG					16
Sphingolipide (%)	40	18			
Stérol (%)	25	25	5		

Tableau 1 : Composition lipidique et ratios lipides/protéines de différentes membranes biologiques⁷.

Les membranes biologiques sont des structures asymétriques et dynamiques (d'où le terme de mosaïque fluide). L'asymétrie des membranes est due à la localisation préférentielle de certaines protéines sur l'un des deux feuillets de la membrane, à la disposition orientée des protéines dans la membrane mais aussi au positionnement extérieur des résidus osidiques liés aux protéines membranaires ou aux lipides. Le taux de renouvellement des différents lipides et protéines membranaires est un paramètre important qui contribue au dynamisme membranaire. En outre, deux types de diffusion participent au dynamisme cellulaire : une diffusion latérale et une diffusion transversale. La diffusion transversale concerne les lipides et certaines protéines qui peuvent diffuser latéralement dans le plan membranaire à la vitesse de plusieurs $\mu\text{m/s}$. La diffusion transversale (ou « flip-flop ») s'effectuant entre les feuillets membranaires, est quant à elle un phénomène beaucoup plus lent qui se produit sur une durée de quelques heures à plusieurs jours^{8,9}.

2.1.3. Rôles de la membrane biologique

Les membranes biologiques délimitent les cellules. Elles sont essentielles à la vie en assurant le maintien de l'intégrité cellulaire. Elles jouent un rôle indispensable de barrière entre l'intérieur d'une cellule (riche en ions notamment potassium, magnésium et phosphate) et l'extérieur (notamment riche en ions sodium, calcium et chlorure). Elles sont relativement imperméables et sélectives. Les différences de composition entre les deux compartiments doivent être maintenues et régulées. Cette régulation peut s'effectuer soit par diffusion libre (un soluté allant de sa concentration la plus forte vers la plus faible par agitation moléculaire thermique), soit par diffusion facilitée (transport passif d'un soluté à l'aide d'un transporteur

spécifique), soit par transport actif (nécessitant de l'énergie par l'utilisation d'un transporteur spécifique ou pompe).

Outre ce rôle vital de barrière biologique, les membranes biologiques ont un rôle structural, un rôle de reconnaissance¹⁰.

2.2. Les lipides

Les lipides sont des éléments clés des membranes. Ils peuvent être classés selon leur rôle énergétique, structural ou fonctionnel. Le rôle énergétique est principalement lié aux triglycérides et acides gras qui permettent la constitution de réserves énergétiques. Les lipides structuraux, en majorité des phospholipides, contribuent à l'architecture membranaire. Enfin, les lipides fonctionnels peuvent jouer le rôle de récepteurs membranaires et de second messenger intracellulaire. Ils peuvent également être impliqués dans des mécanismes d'adhésion et de régulation de la croissance cellulaire.

Dans cette partie, la structure des différentes familles de lipides et leur organisation fonctionnelle en phase aqueuse sont décrites⁷.

2.2.1. Structure des lipides

Outre les triglycérides, lipides composés de trois chaînes carbonées de longueur variable (10 à 18) reliées par une liaison ester à une molécule de glycérol, les autres lipides sont de petites molécules amphiphiles (Figure 3) c'est à dire composées d'une tête polaire (ou hydrophile) et d'une ou plusieurs queues apolaires (ou hydrophobes).

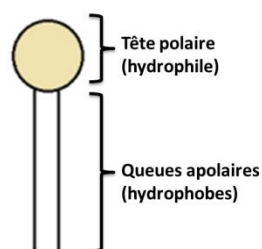


Figure 3 : Représentation schématique d'un lipide.

Il existe trois catégories principales de lipides : les **phospholipides** (ou diacylphosphoglycérides), les **sphingolipides** et les **stérols**. Selon les auteurs, les glycolipides (ou diacylglycoglycérides) sont parfois considérés comme une quatrième catégorie lipidique^{8,9}.

Les phospholipides sont les lipides les plus abondants des membranes biologiques. Le phospholipide, le plus simple, appelé **acide phosphatidique**, est obtenu par estérification du glycérol par deux acides gras (en positions *sn-1* et *sn-2*) et contient un acide phosphorique (en position *sn-3*). Il est l'intermédiaire de synthèse des autres phospholipides. La nature des phospholipides sera dépendante du substituant (choline, inositol, ...) fixé au groupement phosphate de l'acide phosphatidique. Les plus fréquemment rencontrés sont : la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol ou encore le phosphatidylglycérol (Figure 4). Les têtes polaires des phospholipides pourront être chargées (positivement, négativement) ou non. La charge globale du phospholipide est dépendante de la nature du substituant. Ainsi pour les plus répandus : le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) sont chargés négativement, la phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) ne sont pas chargés dans une solution à pH physiologique (pH 7,4)⁷.

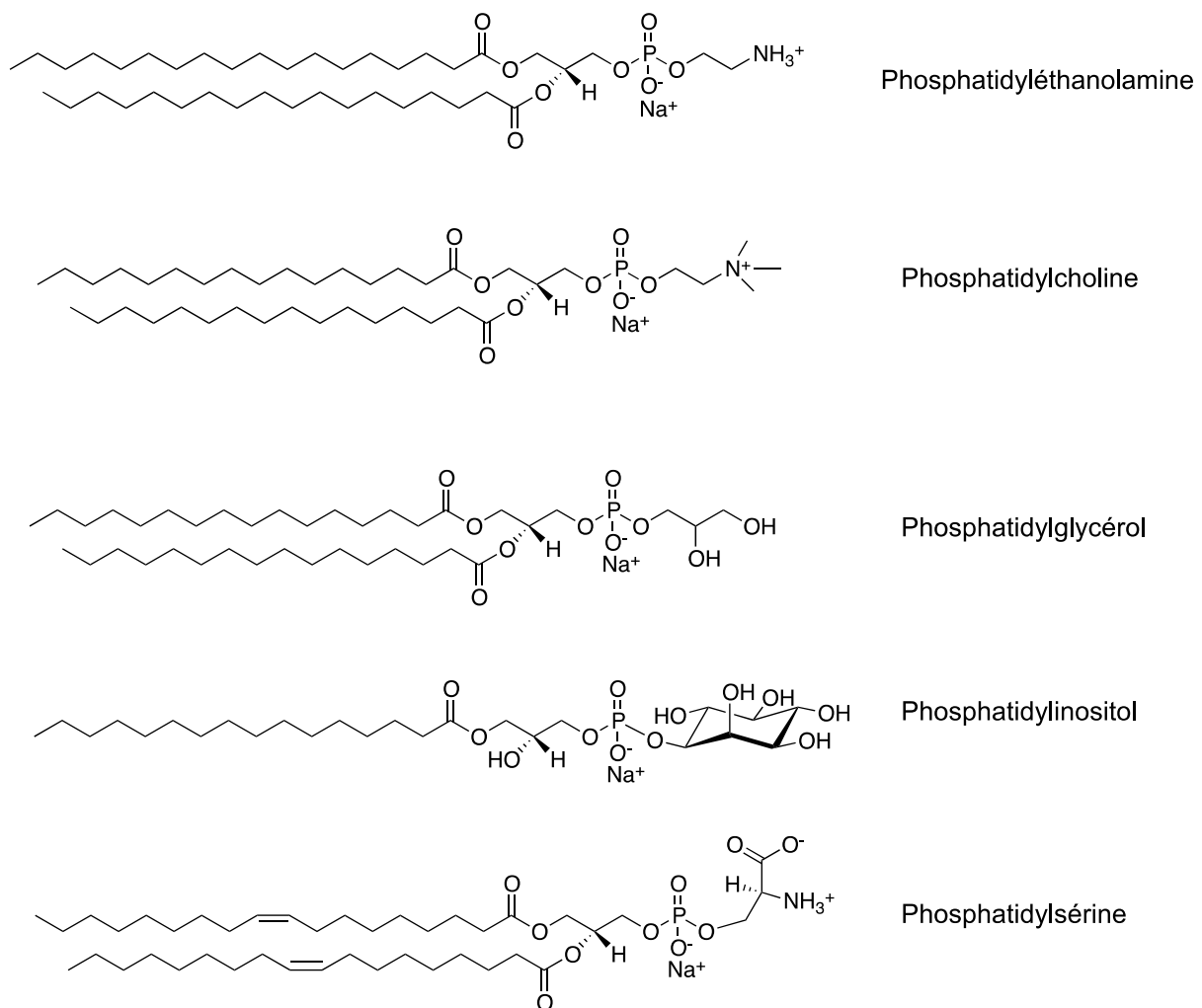


Figure 4 : Structures chimiques de phospholipides fréquemment rencontrés dans les membranes biologiques d'après <http://avantlipids.com>.

Les **sphingolipides** constituent la seconde famille en termes de présence dans les membranes biologiques. Ils sont obtenus par amidification de la fonction amine de la sphingosine par un acide gras à longue chaîne. Le composé obtenu est un céramide, qui sert de base à tous les autres sphingolipides. L'addition d'un substituant sur la fonction alcool primaire du céramide détermine sa nature. Par exemple une sphingomyéline est obtenue par addition d'un groupement phosphate⁶.

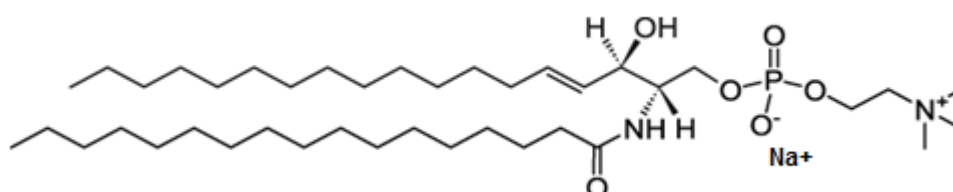


Figure 5 : Structure chimique d'une sphingomyéline d'après <http://avantlipids.com>.

Les **stérois** sont des lipides composés d'un noyau stéroïde plan formé de 4 cycles fusionnés, 3 possédant 6 atomes de carbone et 1 avec 5 atomes de carbone (Figure 6). Les plus connus sont le cholestérol, le stigmasterol et l'ergostérol. A de rares exceptions près, les bactéries ne possèdent pas de stérois⁶.

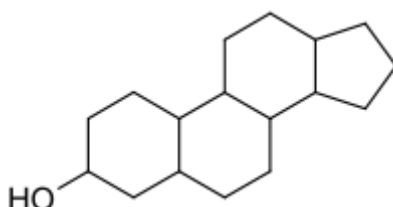


Figure 6 : Structure de base d'un stérol.

2.2.2. Organisation des lipides en solution aqueuse

Du fait de leur nature amphiphile, les lipides ont tendance, dans un environnement aqueux, à s'auto-organiser en une forme permettant de minimiser les interactions défavorables d'un point de vue énergétique entre les groupements hydrophobes des lipides et le milieu aqueux. Selon la nature moléculaire des constituants, cet auto-assemblage pourra former des micelles (têtes polaires hydrophiles en contact avec le milieu aqueux et queues hydrophobes à l'abri du milieu aqueux) (Figure 7a) ou bien des bicouches lipidiques (deux monocouches de lipides associées renfermant les queues hydrophobes des lipides, les têtes polaires se trouvant en contact avec la solution aqueuse) (Figure 7b).

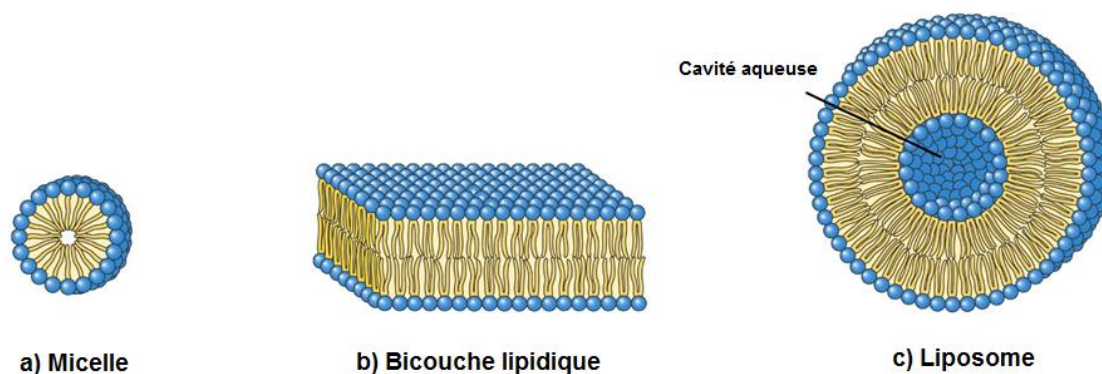


Figure 7 : Différents auto-assemblages lipidiques en solution aqueuse. a) une micelle, b) une bicouche lipidique, c) une vésicule lipidique⁶.

Les phospholipides s'assemblent le plus fréquemment en solution aqueuse sous forme de liposomes (appelés également « vésicule lipidique ») (Figure 7c).

2.3. Les protéines membranaires

2.3.1. Les deux catégories de protéines membranaires

Les bicouches lipidiques renferment des protéines membranaires. La quantité de protéines membranaires présente dans les bicouches lipidiques est variable selon le type de membrane et d'organisme (Tableau 1)⁷.

Les protéines membranaires peuvent être séparées en deux catégories : les **protéines intégrales** (ou **intrinsèques**) et les **protéines périphériques** (ou **extrinsèques**)^{8,10}.

- **Les protéines intégrales** sont les plus nombreuses (Figure 8). Elles sont composées de deux extrémités hydrophiles séparées par une région hydrophobe. En général, elles traversent totalement la membrane biologique, à l'aide de leur région hydrophobe. Les interactions entre les protéines et les parties apolaires des lipides sont des interactions hydrophobes. Certaines protéines ont plusieurs segments transmembranaires, traversant à plusieurs reprises la membrane alors que d'autres n'en possèdent qu'un seul. Les structures en 3D des protéines peuvent être localisées en dehors de la membrane, d'un seul côté ou des deux¹¹.

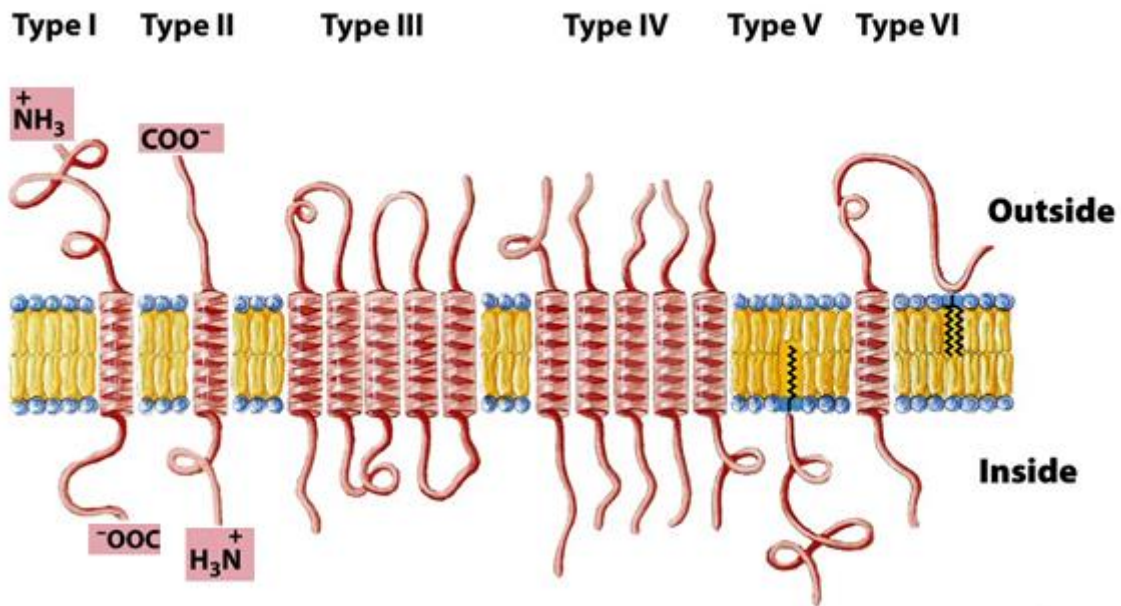


Figure 8 : Représentation schématique des différents types de protéines membranaires intégrales. Les types I et II possèdent une simple hélice membranaire. Les protéines de type III correspondent à un polypeptide simple et ont plusieurs hélices transmembranaires. Les protéines de type IV possèdent des domaines transmembranaires de différents polypeptides assemblés pour former un canal à travers la membrane. Les protéines de type V sont détenues à la bicouche principalement par les lipides liés de manière covalente. Les protéines de type VI ont à la fois des hélices transmembranaires et des ancrs lipidiques¹².

- **Les protéines périphériques** sont quant à elles liées aux têtes polaires des phospholipides membranaires ou à des parties polaires de protéines intégrales spécifiques. Elles sont associées à la membrane soit de manière relativement faible par des interactions électrostatiques de type liaison hydrogène et liaisons de Van der Waals, soit par des interactions covalentes à certains lipides (acide palmitique et acide myristique), soit ancrées sur des glycophosphatidylinositol (GPI) (Figure 9)¹⁰.

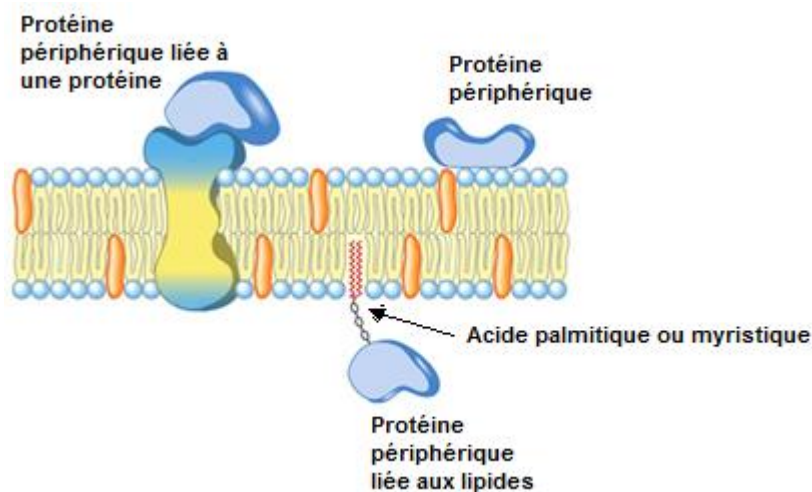


Figure 9 : Représentation schématique des protéines membranaires périphériques, librement inspiré d'après¹².

2.3.2. Rôles des protéines membranaires

Les protéines, second constituant principal des membranes biologiques, sont des macromolécules complexes participant à de nombreuses fonctions essentielles au sein des membranes biologiques. Elles peuvent être réparties en trois catégories:

- **transport de matière.** Cette fonction de transport est réalisée par des transporteurs et des canaux ioniques, permettant le transfert de molécules biologiques d'un compartiment à un autre.⁷

- **transfert d'information.** Ce transfert d'information est médié par des récepteurs fixant les messagers extracellulaires (hormones, neurotransmetteurs, immunoglobulines).⁷ On dénombre trois catégories de récepteurs membranaires : les récepteurs-canaux (dont la fixation d'un ligand augmente la probabilité d'ouverture du canal), les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs à activité enzymatique (possédant un domaine extracellulaire).

- **transformation d'énergie.** Cette fonction provient de la capacité à transformer de l'énergie pour effectuer des transports actifs de solutés et d'ions contre leur gradient de concentration⁷.

2.3.3. Les protéines étudiées

Dans le cadre de ces travaux, deux protéines intégrales ont été particulièrement étudiées : l'Alpha-hémolysine et l'Aquaporine Z. Il est donc intéressant de détailler la structure et le rôle de ces deux protéines membranaires.

2.3.3.1. L'alpha Hémolysine : une protéine modèle

L'Alpha-hémolysine est une protéine présente dans la membrane de la bactérie *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie est impliquée dans la survenue d'infections résistantes aux antibiotiques chez l'homme. Une fois qu'elle a envahi une cellule hôte, la bactérie peut sécréter des facteurs d'adhésion, des toxines ou des enzymes¹³. Dans ces travaux de thèse, nous nous intéresserons uniquement à l'alpha-hémolysine (ou alpha-toxine) sécrétée et formant des pores. L'alpha-hémolysine est une protéine dont la masse moléculaire est de 31 kDa, possédant de 65 à 75% de brins bêta appartenant de ce fait à la catégorie des toxines à brin bêta^{13,14}.

Son activité hémolytique a été mise en évidence chez plusieurs mammifères, avec une efficacité variable selon l'espèce. Ainsi les érythrocytes d'un lapin sont lysés avec de faibles doses de toxine (de l'ordre de 1 nM), tandis que des cellules sanguines humaines le sont avec une concentration plus importante (de l'ordre de 1 μ M)^{13,14}.

- Structure de l'alpha hémolysine

Par l'utilisation combinée de multiples techniques, notamment la microscopie électronique et l'AFM (Figure 10)¹⁵, il est établi que la bactérie secrète les protéines sous forme de monomères (protéines libres hydrosolubles). Ces monomères se lient à la membrane avant de se concentrer par un phénomène d'oligomérisation qui s'effectue à la surface membranaire des cellules cibles pour former un état « pré-pore » puis un pore membranaire heptamérique¹⁶.

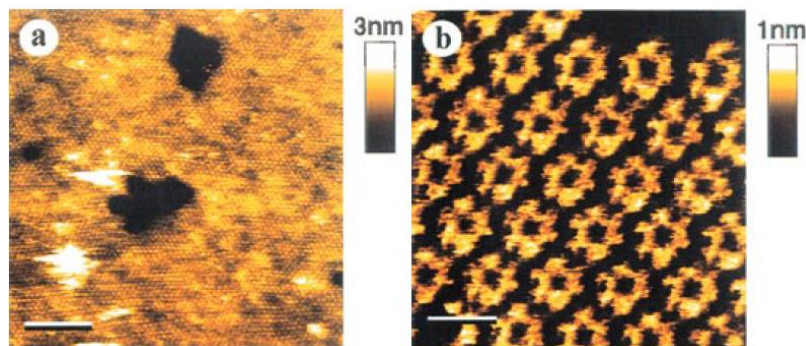


Figure 10 : Structure de l'alpha-hémolysine déterminée par AFM. Les barres d'échelles représentent a) 100 nm, b) 7,5 nm¹⁵.

Ce pore a une masse moléculaire de 232 kDa et ressemble à un champignon¹⁷ (Figure 11). Chaque heptamère mesure 100 Å de hauteur et a un diamètre de 100 Å. Il est constitué de différents domaines : le capuchon, les 7 anneaux et une queue. La queue est la partie définissant le canal transmembranaire, le capuchon, celle formant un domaine hydrophile au-dessus de la surface extracellulaire. Les anneaux se situent entre les deux éléments décrits précédemment.

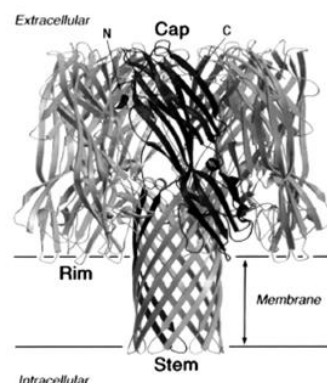


Figure 11 : Représentation en ruban de l'alpha-hémolysine heptamérique. La bicouche membranaire ainsi que le domaine du capuchon, les 7 domaines de l'anneau et celui de la queue sont positionnés sur l'image¹⁶.

Cette protéine est très étudiée comme modèle à la fois pour comprendre les propriétés biophysiques des pores¹⁷, mais aussi dans un but de thérapie antibactérienne¹³. D'autres applications sont à l'étude, comme celles de son utilisation dans le séquençage de génome à travers ce pore, car le pore formé par cette protéine peut contrôler le passage de molécules d'ADN à l'unité. Dans cette application, la molécule d'ADN à séquencer bouche le pore lors de son passage et affecte la conductance ionique du pore qui est mesurée en temps réel. Ces modulations de courant pourraient être mises à profit pour séquencer les bases de l'ADN engagées au niveau de la constriction du pore¹⁸.

2.3.3.2. L'Aquaporine Z

L'Aquaporine Z fut la première aquaporine bactérienne identifiée produite par la bactérie *E. coli*¹⁹. Cette protéine fait partie de la grande famille des Aquaporines (parfois appelées « aquaglycéroporines »)²⁰ que l'on retrouve chez des organismes vivants allant de la bactérie aux mammifères en passant par les plantes et les levures. Elle joue un rôle physiologique central en régulant les mouvements d'eau et d'alcools aliphatiques à travers les membranes cellulaires^{20,19}. Les rôles des différentes aquaporines sont hautement spécialisés²⁰. Les Aquaporines Z sont des transporteurs passifs hautement sélectifs²¹. Elles sont impliquées dans de nombreux processus tels que l'osmorégulation et l'expansion de volume dans une croissance rapide de cellules¹⁹.

- Structure de l'Aquaporine Z

De nombreuses études ont permis de mieux connaître sa structure, notamment des études par cryo-microscopie électronique^{22,23} (Figure 12 c), analyse par rayon X haute résolution²¹ et par AFM²⁴ (Figure 12 a,b). L'Aquaporine Z possède 6 domaines transmembranaires et 5 boucles de connexions (Figure 13). Le canal qu'elle constitue est long (28 Å) et étroit et son diamètre est inférieur à 4 Å. Ce canal s'élargit au niveau de ses vestibules périplasmiques et cytoplasmiques.

L'AFM a par exemple permis d'obtenir des données structurales complémentaires de l'AqpZ dans un environnement natif (Figure 12). Pour cela des cristaux de 10-His-AqpZ (Aquaporine Z portant une étiquette poly-histidine) ont été construits puis l'étiquette histidine a été éliminée par digestion à la trypsine afin de mener les observations.

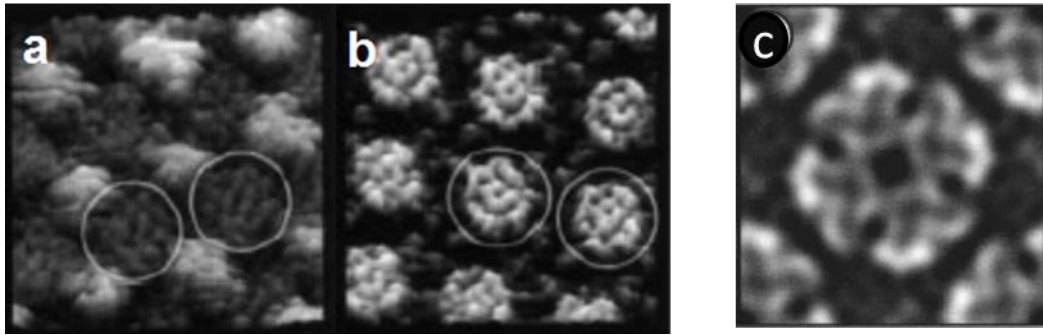


Figure 12 : a,b) Images d'aquaporine Z obtenues avec la technique de microscopie à force atomique (AFM) (images 150 Å x 150Å)²⁴. c) Carte de projection cryo-électronique de l'AqpZ (image 47,5Å x 47,5Å)²².

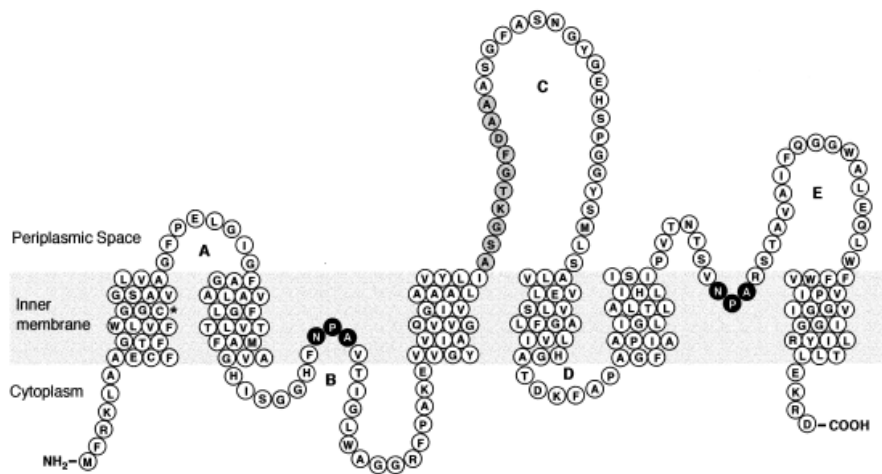


Figure 13: Topologie prédictive de la protéine Aquaporine Z d'*E.coli*¹⁹.

L'Aquaporine Z est une protéine modèle pour des recherches en Biophysiques²². Elle est notamment très étudiée pour des applications potentielles de purification de l'eau (désalinisation)²⁵.

3. Des membranes biologiques aux modèles membranaires

3.1. Généralités

L'intégrité des membranes est importante et doit donc être maintenue afin d'assurer le fonctionnement normal des cellules et plus largement des êtres vivants. Des altérations ou des déficits de certains composants membranaires peuvent avoir d'importantes conséquences sur les processus se déroulant à l'intérieur de la cellule. A titre d'exemple, nous pouvons citer la mucoviscidose, maladie due à des mutations dans le gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), transporteur d'ions chlorure¹⁰. Du fait de leur importance biomédicale, les membranes (et les éléments qui les composent) sont par conséquent très étudiées.

Afin d'appréhender plus en détail certains processus biologiques (mécanismes de transport, maintien de gradient chimiosmotique, transduction d'énergie notamment) des « **bicouches lipidiques artificielles** » peuvent être utilisés en tant que modèle de membranes biologiques. Elles sont généralement composées d'un ou plusieurs phospholipides d'origine naturelle ou synthétique qui peuvent être soit utilisés sous forme de liposomes, de monocouches lipidiques ou de bicouches phospholipidiques planes. Dans de tels systèmes, le contenu lipidique peut par exemple être modifié permettant d'observer les effets des compositions lipidiques sur certaines fonctions biologiques. Il est également possible d'y incorporer des protéines membranaires ou encore de contrôler l'environnement en modifiant notamment la concentration ionique du milieu.

3.2. Les liposomes

3.2.1. Structure des liposomes ou vésicules

Les liposomes proposés en tant que modèles membranaires sont des vésicules lipidiques closes (Figure 7c), qui se forment spontanément quand les lipides sont dispersés dans un milieu aqueux. Les interactions entre les têtes lipidiques et l'eau entraînent la formation de systèmes multilamellaires et unilamellaires. Une variété de phospholipides naturels et synthétiques est disponible pour la préparation de liposomes. Les liposomes peuvent être classés selon leur nombre de bicouches (unilamellaire ou multilamellaire) ou selon leur taille généralement comprise entre 10 nm et 50 µm. On parle alors de **petites** vésicules pour des tailles allant de 10 à 100 nm²⁶ (*Small Unilamellar Vesicles : SUV*), de vésicules **larges** pour des diamètres de 100 nm à 1 µm²⁶ (*Large Unilamellar Vesicles : LUV*) ou de vésicules **géantes** de taille supérieure à 1 µm²⁶ (*Giant Unilamellar Vesicles : GUV*)^{8,9,27}.

3.2.2. *Intérêts de l'utilisation de liposomes*

Les liposomes sont utilisés dans de nombreuses applications biotechnologiques. Parmi les applications possibles les plus fréquentes, nous pouvons citer :

- Les **études de perméabilité d'une bicouche lipidique**. Pour cela, les liposomes sont préparés avec une solution donnée. Il suffit ensuite de changer la solution aqueuse externe et de mesurer la vitesse à laquelle la solution renfermée dans les liposomes diffuse à travers la bicouche lipidique²⁸.
- Les **études portant sur la fonctionnalité de protéines**. Des protéines membranaires purifiées sont insérées dans les liposomes formant ainsi des protéoliposomes. Ceci permet par exemple de mimer l'incorporation des protéines dans les membranes^{29,30}.
- La **délivrance de médicaments (« drug design »)**. Des médicaments solubles ou non peuvent être encapsulés dans des liposomes unilamellaires qui sont véhiculés dans l'organisme après injection²⁷. Les liposomes peuvent fusionner avec des membranes cellulaires ou être intégrés dans des cellules par un phénomène d'endocytose. La principale limitation de cette technique est le temps de survie limité des liposomes dû au fait qu'ils sont rapidement éliminés par les cellules phagocytaires. De plus, ils s'accumulent principalement dans le foie et la rate au lieu de se rendre à leur destination. Pour y remédier, des techniques modifiant les liposomes, par exemple par l'ajout de polyéthylène glycol, ont été mises en place. Ces nouveaux types de liposomes trouvent par exemple des applications dans le traitement de chimiothérapies anticancéreuses.
- La **thérapie génique**. Des gènes ou plasmides peuvent être encapsulés dans des liposomes. L'intérêt de cette encapsulation d'ADN le rend moins sensible à l'attaque des nucléases présentes dans les cellules⁷.
- La **cosmétique**. Des principes actifs peuvent être encapsulés dans les liposomes⁷.

3.2.3. *Méthodes de fabrication des liposomes*

De nombreuses méthodes peuvent être employées pour former des liposomes. Le choix de la méthode est dépendant de la taille de liposome attendue et de l'application biotechnologique pour laquelle des liposomes sont requis.

Les méthodes les plus communément employées pour former des liposomes sont l'extrusion, la sonication, la technique gel-dégel, l'électro gonflement. Ces procédés sont décrits brièvement ci-après⁹.

- L'extrusion

La technique de l'extrusion, privilégiée pour l'obtention de petits liposomes (SUVs) et parfois de liposomes plus grands (LUVs), consiste en l'extrusion à forte pression de vésicules multilamellaires à travers des pores de membranes de polycarbonate³¹. Pour réaliser cette extrusion, les lipides sont dans un premier temps dissous dans un solvant organique. Ce solvant est ensuite évaporé et les lipides sont remis en suspension dans une solution aqueuse par agitation. Les liposomes qui se forment en solution sont des liposomes multilamellaires (Multilamellar lipid vesicle : MLV) très hétérogènes (Figure 14). Le passage de cette solution à travers des membranes de polycarbonate composées de pores de tailles décroissantes permet l'obtention de liposomes de taille homogène et unilamellaires⁷.

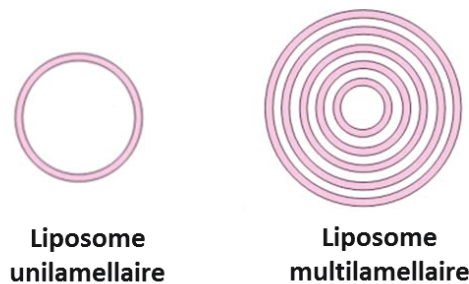


Figure 14 : Représentation schématique d'un liposome unilamellaire et d'un liposome multilamellaire (MLV)³².

- La sonication

La sonication est également très utilisée pour former des SUVs. Après la formation de MLVs obtenus de la même façon que celle décrite pour l'extrusion, des ultrasons (par bain à soniquer ou tige à soniquer) sont utilisés pour casser les MLVs et produire des liposomes de petites tailles. Il peut s'ensuivre une étape de centrifugation pour supprimer les nanoparticules de titane provenant de la tige à soniquer utilisée pour produire des suspensions de liposomes³³.

- Le Gel-dégel

Cette technique (plus connue sous le terme anglais « freeze-thaw ») est utilisée pour produire des LUVs. Ce système permet d'induire la fusion de SUVs de taille définie en faisant plusieurs cycles gel-dégel³⁴.

- L'électro-gonflement

Une autre méthode utilisable est celle de l'électro-gonflement (en anglais « electroswelling ») introduite en 1986 par Angelova et Dimitrov³⁵. Un film lipidique est déposé en parallèle sur deux surfaces homogènes conductrices placées dans une cuve. Après évaporation du solvant sous un flux d'azote, une solution aqueuse est ajoutée et un courant

électrique alternatif est appliqué (Figure 15). Sous l'influence de ce courant électrique, les vésicules se forment. Cette méthode permet d'augmenter le rendement en liposomes et de réduire le temps de préparation en évitant les hautes températures pouvant endommager les composants biologiques³⁶.

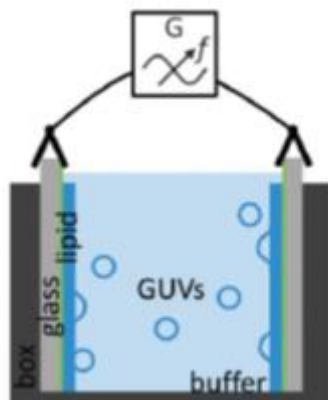


Figure 15 : Schéma montrant la technique d'électro-gonflement permettant l'obtention des GUVs³⁶. Un film lipidique est appliqué sur deux surfaces conductrices. Ces surfaces sont ensuite placées dans une cuve. Cette cuve est ensuite remplie d'une solution aqueuse. L'application d'un courant électrique entre les deux surfaces induit la formation de vésicules.

Une approche alternative basée sur l'électro-gonflement peut également être utilisée (Figure 16). L'électrode est remplacée par un substrat de silicium micro-structuré permettant un dépôt contrôlé de lipides dans des trous de 400 nm de diamètre. Après évaporation du solvant, un film multicouche de phospholipides est obtenu. Un courant alternatif est ensuite appliqué provoquant la formation de liposomes^{36,37}.

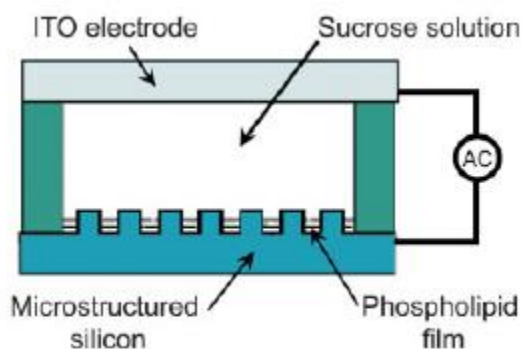


Figure 16 : Schéma du système expérimental d'électrogonflement. Un film multicouche de phospholipides est formé sur un substrat de silicium micro-structuré. L'application d'un courant alternatif permet la formation de liposomes. Après leur formation, les liposomes se trouvent dans une solution de sucrose³⁷.

- Le jet microfluidique

Dans cette méthode, le piston d'une seringue est poussé pour produire et contrôler un jet fluide visant une bicouche lipidique plane préformée. La bicouche lipidique se déforme permettant la formation d'un liposome sous l'impulsion du jet³⁶.

- La double-émulsion

Cette méthode utilisée pour la fabrication de GUVs se fait en deux étapes. Des doubles émulsions (de l'eau dans de l'huile puis dans l'eau) sont générées en utilisant un dispositif microfluidique combinant deux flux. Les liposomes sont obtenus à partir de ces émulsions en supprimant le solvant par évaporation ou dialyse (Figure 17)³⁶.

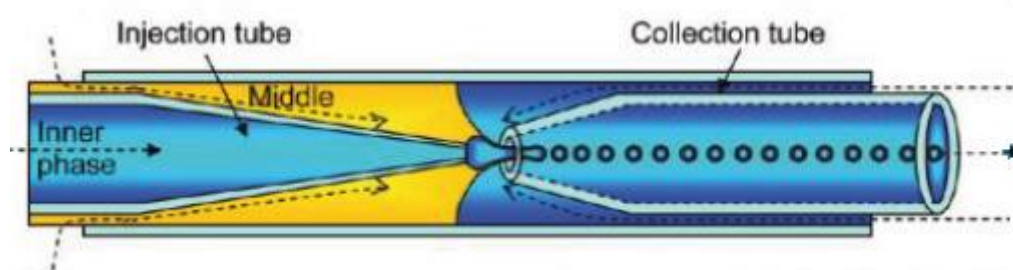


Figure 17 : Schéma descriptif de la méthode double-émulsion permettant de former des liposomes³⁸.

3.2.4. Caractérisation des liposomes

La vérification de la distribution de la taille des liposomes pourra être caractérisée par cryofracture et microscopie électronique ou par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La méthode DLS est privilégiée car la technique de cryofracture est relativement longue et ne permet pas en général une bonne reproductibilité et fiabilité des mesures²⁷. Les méthodes de caractérisation utilisées pour l'étude des liposomes diffèrent selon leur taille. Ainsi les GUVs de taille proche des cellules pourront être étudiées par microscopie à fluorescence²⁶, par *microscopie à contraste interférentiel en réflexion* (RICM³⁹) permettant de mieux comprendre les phénomènes d'adhésion, par pinces magnétiques⁴⁰ ou encore par microscopie à force atomique (AFM)³⁶.

3.3. Les membranes planes

Une alternative aux liposomes pour fabriquer des membranes biomimétiques est l'utilisation de bicouches lipidiques planes. Ce type de membranes biomimétiques fera l'objet d'une étude privilégiée dans nos travaux. Plusieurs types de membranes lipidiques planes ont été développés. Selon le type de membrane biomimétique utilisé, différentes techniques de formation pourront être employées.

Nous aborderons dans un premier temps, les procédés de formation des membranes planes les plus fréquemment rencontrés. Puis, dans un second temps nous exposerons les différents types de membranes planes existantes.

3.3.1. Formation des membranes lipidiques planes

3.3.1.1. Technique dite du pinceau (« Painting technique »)

Plusieurs méthodes dites du pinceau (en anglais « painting method ») existent.

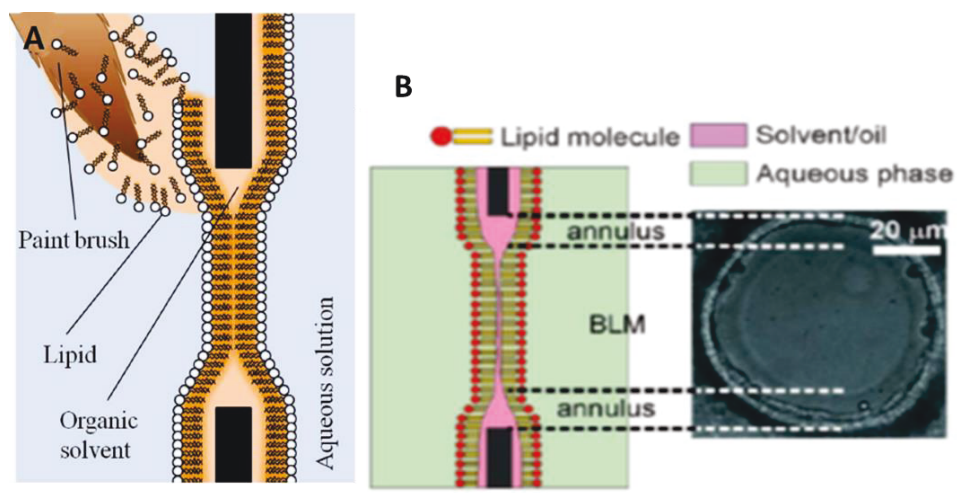


Figure 18 : Formation d'une bicouche lipidique à l'aide de la méthode dite de « painting ». A) Le mélange solvant/lipides est « brossé » à travers l'ouverture des deux côtés. Les deux monocouches lipidiques s'associent pour former la bicouche lipidique⁴¹. B) A gauche, schéma d'une bicouche lipidique formée par la méthode de « painting ». A droite, une image de la BLM formée à travers l'ouverture montrant l'anneau de Gibbs⁴².

Toutes consistent en la formation d'une membrane lipidique sur une petite ouverture inférieure à 1 mm de diamètre. Ce trou est formé dans un matériau hydrophobe tel que le téflon (Figure 18). Les compartiments sont remplis avec une solution aqueuse. Une solution de lipides dissous dans un solvant organique est « peinte » sur l'ouverture avec une brosse ou une tige, formant un film de solvant lipidique épais. Une monocouche lipidique est spontanément formée à l'interface entre les phases organiques et aqueuses sur chaque côté des films. Le solvant s'évapore formant une bicouche lipidique. Une région annulaire fine est laissée autour du bord de l'ouverture. Cet anneau est essentiel pour une stabilité de la bicouche lipidique et est connu sous le nom de Plateau de Gibbs (Figure 18)⁴². Le seul inconvénient de cette technique de formation de bicouche lipidique est liée à l'utilisation d'un solvant qui peut affecter la fluidité de la membrane et potentiellement empêcher la reconstitution de canaux ioniques^{42,43}.

3.3.1.2. Technique de Langmuir-Blodgett

Dans le cas de la formation d'une bicouche lipidique par la technique de Langmuir-Blodgett^{44,45}, les molécules lipidiques s'orientent spontanément à l'interface air-eau. Le film de lipides ainsi formé est comprimé de chaque côté. Quand la cohésion du film est suffisante, l'application d'un support solide hydrophile ou hydrophobe traversant verticalement le film permet de prélever une monocouche lipidique. Si le support est hydrophile, les « têtes » seront en contact avec le support, à l'inverse pour un support hydrophobe, ce seront les « queues » des lipides qui interagiront avec le support. Selon le nombre de passage du support dans l'interface, des monocouches successives pourront être empilées (Figure 19)⁹.

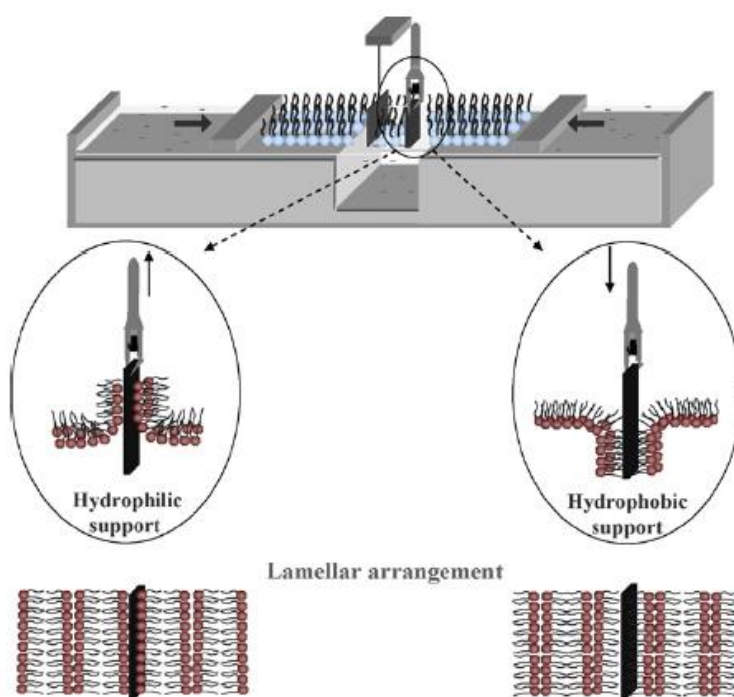


Figure 19 : La technique de Langmuir-Blodgett⁴⁴.

3.3.1.3. Technique de Langmuir-Schaëffer

Dans le cadre de la formation d'une bicouche lipidique, l'utilisation de la technique de Langmuir-Blodgett peut être couplée avec la procédure de Langmuir-Schaëffer⁴⁶ pour le transfert de la couche lipidique supérieure (Figure 20). Dans cette méthode, le support contenant la monocouche lipidique est déposé horizontalement au niveau de l'interface eau-lipides. Cette technique couplant les procédés de Langmuir-Blodgett et de Langmuir-Schaëffer permet de préparer des bicouches lipidiques asymétriques.

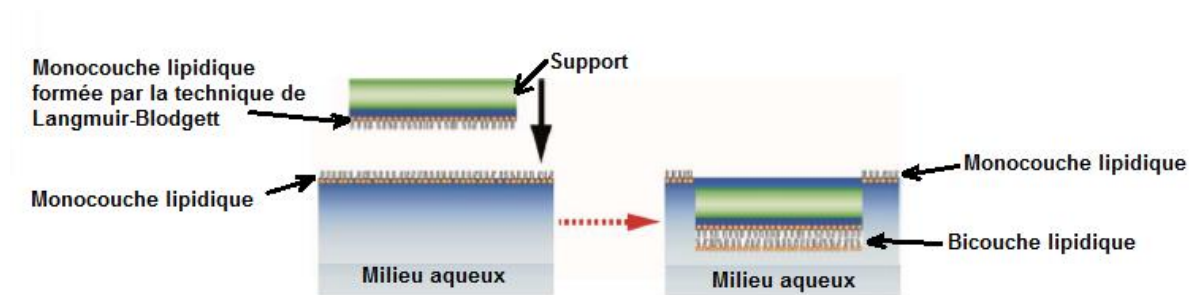


Figure 20 : Technique de Langmuir-Schäfer⁴⁶

3.3.1.4. Technique Montal-Mueller

Une technique alternative à la formation d'une bicouche lipidique asymétrique ou non par la technique de Langmuir-Blodgett est la technique de Montal-Mueller⁴⁷. Cette formation de bicouche plane en l'absence de solvant organique par apposition de deux monocouches lipidiques à l'interface air-eau permet de séparer deux compartiments aqueux. Les deux monocouches sont séparées par un septum déplaçable verticalement contenant en son centre un trou de 1 cm de diamètre recouvert la plupart du temps par un film fin de téflon (tetrafluoroéthylène) hydrophobe d'environ 25 μm d'épaisseur favorisant le contact avec les chaînes hydrocarbonées des lipides. Ce septum peut être déplacé à l'aide d'un moteur. L'ouverture bouge du haut vers le bas jusqu'à la surface de la solution aqueuse (Figure 21)⁴⁷.

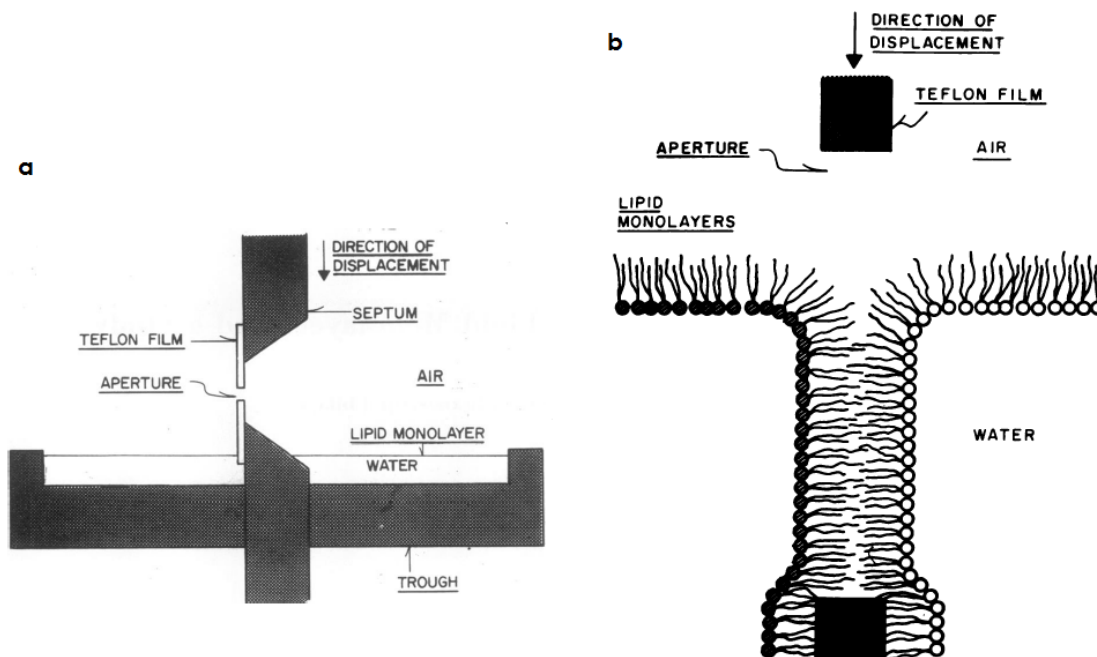


Figure 21 : a) Schéma simplifié du dispositif de formation de la bicouche lipidique. b) Principe de formation d'une bicouche lipidique par apposition de deux monocouches lipidiques à l'interface eau-air⁴⁷.

3.3.1.5. Fusion lipidique

La technique de fusion lipidique est une méthode permettant la formation de bicouches lipidiques planes⁴³. Cette fusion est initiée par la mise en contact d'une solution lipidique avec une surface plane. La chimie de surface, la charge du support, la pression osmotique et la taille des vésicules sont des facteurs importants pour contrôler l'adsorption de vésicules et leur rupture sur une surface plane^{42,43}.

Pour les vésicules qui ont une charge superficielle opposée à celle de la surface du support, une fois qu'elles ont adhéré à la surface, il est présumé qu'elles sont aplaties sur la surface par des interactions électrostatiques et de Van der Waals et adoptent une forme de disque⁴³. Dès que la concentration en liposomes sur la surface atteint un seuil critique, les liposomes commencent à se rompre et s'assemblent en une bicouche lipidique plane (Figure 22)⁴³.

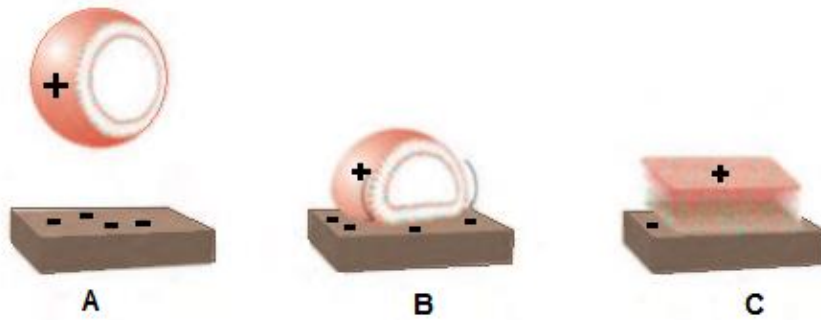


Figure 22 : Fusion de vésicules sur un substrat solide. A) Vésicules avec une charge opposée à la charge de surface sont attirées sur la surface. B) Les vésicules adhèrent à la surface et les vésicules sont déformées. C) Après avoir atteint un certain seuil de concentration sur la surface, les vésicules se rompent pour former une bicouche lipidique⁴³.

Plusieurs mécanismes de rupture de liposomes ont été décrits selon les conditions expérimentales (Figure 23)³¹ :

- Les liposomes peuvent se rompre spontanément suite à leur déformation sur la surface (Figure 23 a).
- Les vésicules peuvent fusionner entre elles avant de se rompre (Figure 23 b).
- Le bord d'un domaine lipidique peut induire la rupture d'un liposome (Figure 23 c).
- Plusieurs liposomes peuvent avoir une action coopérative, un premier liposome se rompt entraînant la rupture des autres liposomes (Figure 23 d).

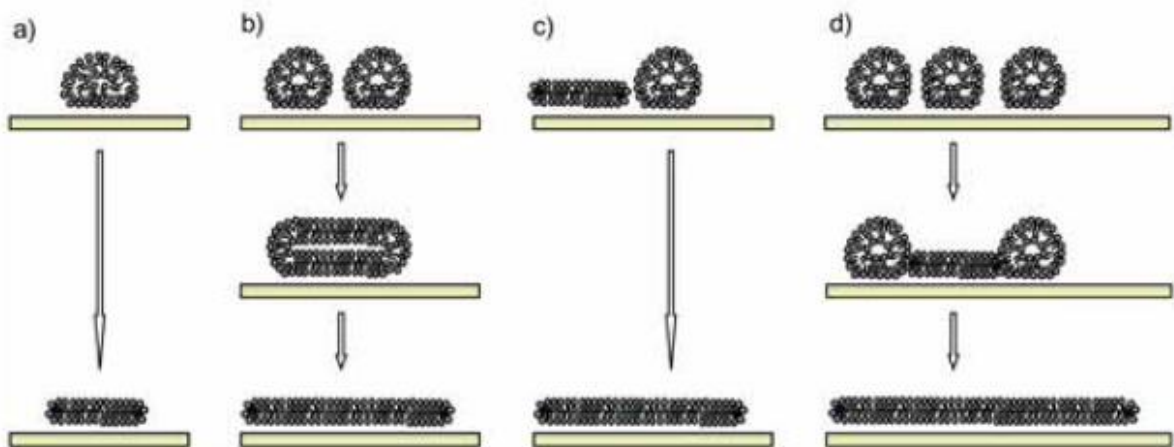


Figure 23 : Les différentes voies de dépôt des liposomes⁴⁸.

3.2.2. Les différents modèles de membranes planes

3.2.2.1. Les bicouches lipidiques supportées

Les bicouches lipidiques supportées (SLBs) formées sur un support solide, aussi appelées bicouches phospholipidiques supportées (SPBs), sont des modèles membranaires très utilisés depuis les travaux de l'équipe de Mc Connell dans les années 80^{49,50}. Ils ont été les premiers à observer que de telles structures se forment spontanément lorsque des suspensions de liposomes ou de membranes biologiques sont déposées sur des lamelles de verre (Figure 24).

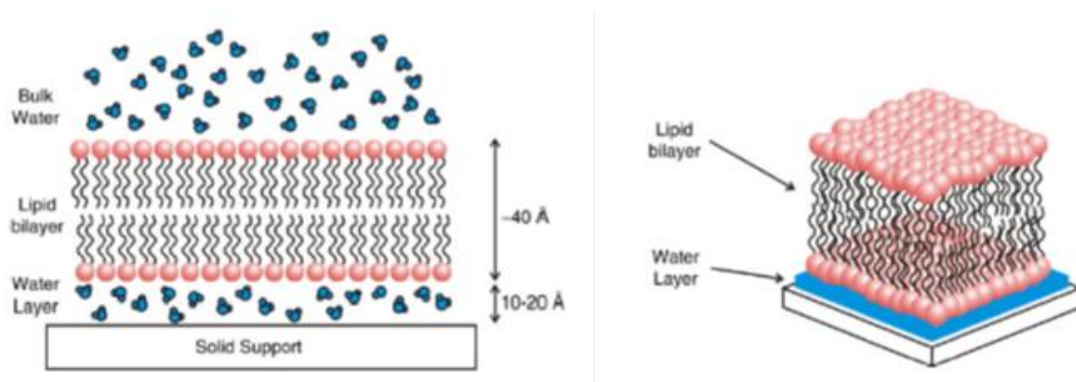


Figure 24 : Schéma d'une bicouche phospholipidique supportée solide, la membrane est séparée du substrat par une couche mince d'eau³¹.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour former des bicouches phospholipidiques supportées (cf. 3.3.1). Les plus couramment utilisées sont la **technique de Langmuir-Blodgett** couplée à celle de **Langmuir-Schaëfer**, la **fusion de vésicules** ou une combinaison de ces techniques (**technique de Langmuir-Blodgett et fusion de vésicules**) (Figure 25)^{8,9,31,51}.

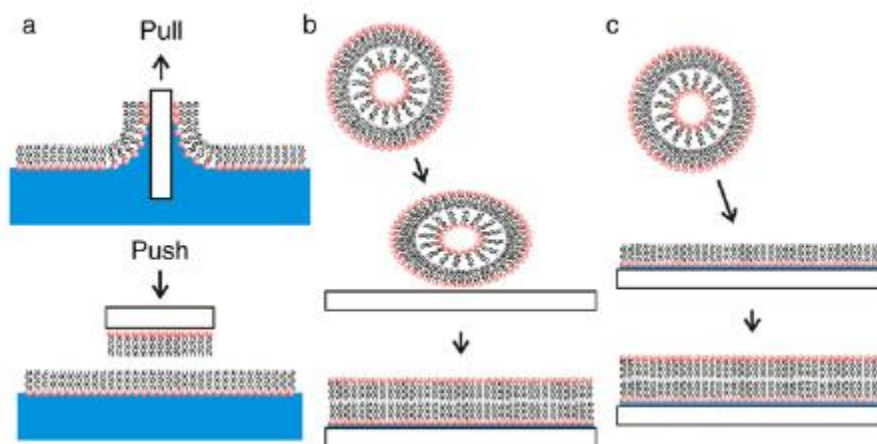


Figure 25 : Techniques couramment utilisées pour la formation de bicouches lipidiques supportées. a) La technique de Langmuir-Blodgett, b) L'adsorption de vésicules en solution suivie de la fusion spontanée de ces vésicules sur la surface pour former une bicouche lipidique supportée, c) Une combinaison des procédés de Langmuir Blodgett et de fusion de vésicules³¹.

La technique de fusion de vésicule est très souvent privilégiée puisque cette technique présente l'avantage de former par une méthode relativement simple des bicouches lipidiques planes.

- Les bicouches lipidiques supportées par fusion lipidique

Les bicouches lipidiques supportées formées par fusion lipidique font l'objet d'une étude plus approfondie dans le cadre de ces travaux de thèse. Pour leur formation, plusieurs types de supports plans dont la surface est rendue hydrophile, peu rugueuse et propre³¹ peuvent être utilisés. Les meilleurs substrats en termes de fusion de vésicules sont la silice,^{52,53} le mica^{54,55}, le silicium oxydé^{56,57,58,59}. D'autres substrats peuvent également être utilisés, c'est le cas de l'or (Au)^{56,58,60,61}, du dioxyde de titane (TiO₂)^{57,58,62}, de l'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO)⁶³, de l'argent, du quartz⁶⁴, du platine³¹, de polymères (PDMS, ...).

- Modes de formation des bicouches lipidiques supportées par fusion lipidique

Suite au développement de nouvelles méthodes de caractérisation des processus moléculaires de surface telles que des méthodes d'imagerie (microscopie à force atomique (AFM), recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP), microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF)) et des méthodes permettant de suivre en temps réel l'adsorption de molécules sur un support (QCM-D, SPR, ellipsométrie), de nombreux travaux ont permis de mieux appréhender la compréhension des mécanismes de formation des bicouches lipidiques supportées par fusion lipidique.

Selon le type de surface et les conditions expérimentales, le comportement des liposomes sur la surface diffère considérablement. A titre d'exemple, sur dioxyde de silicium (SiO₂), surface très utilisée pour la formation de bicouches lipidiques supportées, Keller et coll⁶⁵ ont émis l'hypothèse que les vésicules commencent à se rompre sur cette surface après qu'un seuil de recouvrement critique de liposomes soit atteint⁶⁵.

Au total, quatre modes de formation d'une SLB différents selon le support plan utilisé ont été distingués (Figure 26) :

- Formation de vésicules supportées (c'est-à-dire une monocouche de vésicules intactes sur la surface) (Figure 26 a).
- Formation d'une bicouche lipidique supportée après adsorption à faible recouvrement critique (Figure 26 b).
- Formation d'une bicouche lipidique supportée après l'adsorption de vésicules jusqu'à un haut niveau de recouvrement critique (Figure 26 c).
- Pas d'absorption de vésicules sur la surface (Figure 26 d).

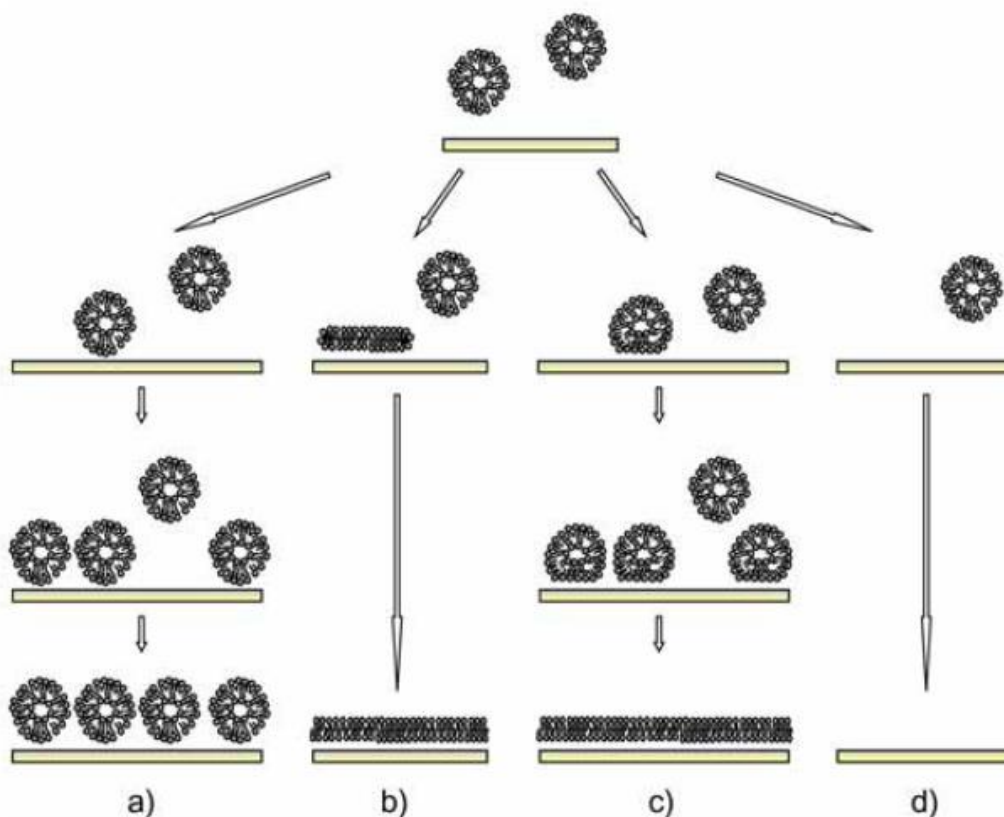


Figure 26 : Mécanismes de formation des SLBs : a) Formation de vésicules supportées (c'est-à-dire une monocouche de vésicules intactes sur la surface) ; b) Formation d'une bicouche lipidique supportée après adsorption à faible recouvrement critique ; c) Formation d'une bicouche lipidique supportée après l'adsorption de vésicules jusqu'à un haut niveau de recouvrement critique ; d) Pas d'absorption de vésicules sur la surface⁴⁸.

Ces modes de formation de bicouche lipidique supportée dépendent de nombreux paramètres tels que le **type de support** utilisé (composition chimique, charge, rugosité, hydrophilie), le **type et la concentration d'ions en solution**⁵⁵, l'utilisation **d'agents facilitant la fusion**, la **charge des vésicules**, le **pH** de la solution⁵³, la température, la pression osmotique⁶⁶. L'influence de certains de ces paramètres sur la formation de bicouches lipidiques est décrite plus en détail dans la suite.

- Le support

Selon le type de surface choisie, des bicouches lipidiques planes pourront ou non être formées. En 1998, Keller et Kasemo⁶⁷ ont caractérisé par la technique de microbalance à cristal de quartz et dissipation (QCM-D) les différences d'adsorption de liposomes de 25 nm de diamètre sur trois différentes surfaces : SiO₂, Au « oxydé » et Au fonctionnalisé par des monocouches auto-assemblées (SAM) possédant une extrémité thiol et une terminaison méthyl (Figure 27). Ils ont ainsi montré que sur SiO₂ il y a formation d'une SLB en deux phases (adsorption de vésicules intactes puis formation d'une SLB) avec une valeur caractéristique de variation de fréquence (ΔF) de - 25 Hz quand la bicouche lipidique est

formée. Sur Au oxydé, les vésicules intactes sont adsorbées tandis que sur les SAM, une adsorption d'une monocouche lipidique est obtenue ($\Delta F = 13 \text{ Hz}$)⁶⁷.

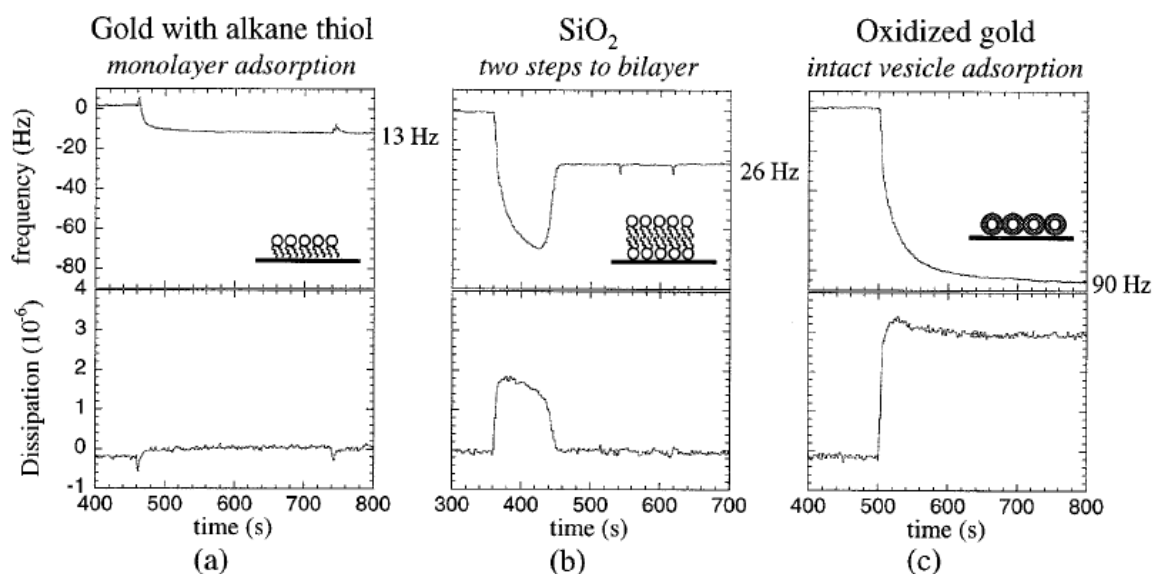


Figure 27 : Adsorption de liposomes sur différentes surfaces. a) surface Au recouverte de SAM, b) SiO_2 , c) Au oxydé⁶⁷.

Sur SiO_2 les bicouches lipidiques se forment spontanément suite au dépôt de liposomes en solution sur la surface. En revanche, sur TiO_2 les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus sur Au oxydé⁵⁶, à savoir une monocouche de vésicules adsorbées. Les cinétiques d'adsorption de vésicules sur SiO_2 et TiO_2 ne sont pas fortement dépendantes de la taille des vésicules. La principale différence réside dans le fait que les vésicules sont plus aplaties sur SiO_2 que les vésicules adsorbées sur TiO_2 . Ceci est dû à une interaction plus importante sur SiO_2 entre les vésicules et la surface⁵⁷.

- Les agents facilitant la fusion

* Les ions monovalents et divalents

L'utilisation d'ions peut permettre la formation de bicouches lipidiques planes sur des surfaces initialement non favorables à la fusion lipidique. Il a ainsi été démontré que des bicouches lipidiques supportées peuvent être formées à partir de vésicules anioniques en présence de Ca^{2+} sur de l'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO)⁶³. De même sur TiO_2 , des liposomes composés de 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) se rompent en présence de Ca^{2+} ^{68,69}.

Il a été montré que la présence de calcium a une influence plus prononcée sur le procédé de fusion des liposomes sur certains types de surface tel que le mica⁵⁵. Par l'utilisation combinée de la QCM-D, de l'AFM et de l'ellipsométrie, il a été montré qu'en

variant la composition des vésicules et la balance calcium-EDTA, tous les modes de formation de bicouches lipidiques par fusion de liposomes peuvent se produire sur le mica⁵⁴.

D'autres cations mono et divalents ont été testés afin de connaître leur influence sur la formation de bicouches lipidiques supportées suite au dépôt de vésicules de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) sur une surface de SiO₂. A l'aide de la technique de QCM-D, il a été montré que les cations divalents causent une forte réduction de la couverture critique de surface vésiculaire à partir de laquelle la fusion de vésicules a lieu. Cet effet augmente dans l'ordre $\text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$. Les cations monovalents donnent des résultats similaires dans l'ordre $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$, néanmoins, leur action est de moindre importance. La présence d'ions augmentent les interactions entre la surface et les vésicules ainsi que les interactions répulsives entre les vésicules⁷⁰.

* Les molécules facilitant la fusion

Plusieurs types de molécules ont été répertoriés pour leur capacité d'induction de la fusion de liposomes. Le plus connu et le plus communément employé d'entre eux est le **polyéthylène glycol** (PEG)^{31,71,72}. D'autres tels le **Triton X-100**⁶⁰ ou plus récemment l'**alpha peptide**^{58,73} peuvent également être utilisés.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous focaliserons plus en détail sur le mécanisme de fusion induit par l'**alpha peptide** sur des surfaces planes recouvertes d'or.

- L'*alpha peptide* :

Jusqu'au milieu des années 2000, on considérait que les vésicules s'adsorbaient en une monocouche de liposomes sans fusionner sur une surface d'or. Cho et coll.⁷³ ont montré et caractériser à l'aide de la technique de QCM-D que l'ajout d'un alpha peptide sur des vésicules de POPC adsorbées sur l'or permettait de provoquer la fusion des vésicules et de former une bicouche avec des signaux caractéristiques connus en QCM-D, soit une variation de fréquence ΔF de -25 Hz⁷³. Cet alpha peptide est un peptide amphipatique, hélicoïdal issu de la protéine NS5A (« non structural 5A protein ») provenant du virus de l'hépatite C dont la séquence est la suivante : SWLRDVWDWICTVLTDFKTWLQSKLDYKD.

En combinant l'utilisation de l'ellipsométrie et de la QCM-D, les auteurs ont proposé une hypothèse du mécanisme de fusion des vésicules sur l'or à l'aide de l'alpha peptide (Figure 28). Après la formation d'une monocouche de vésicules intactes sur la surface d'or, l'alpha peptide ajouté se lie aux vésicules, conduisant au gonflement de celles-ci et à des événements de fusion. Les vésicules commencent ensuite à se rompre du fait de leur gonflement. Durant cette étape des molécules d'alpha peptide, des lipides et des vésicules désorbent. Les vésicules partiellement rompues se répandent sur la surface. Les fragments

de bicouches adsorbés induisent la rupture des vésicules non rompues pour ainsi former une bicouche lipidique supportée complète sur la surface⁷⁴.

Suite à ces travaux sur l'or, l'alpha peptide a également été utilisé sur l'oxyde de titane (TiO₂) pour former des bicouches à partir de vésicules lipidiques zwitterionique⁵⁸. Plus récemment, des vésicules avec une composition lipidique plus complexe 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) / 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) / 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) / Sphingomyéline (SM) ont été formées par fusion en utilisant l'alpha peptide⁷⁵.

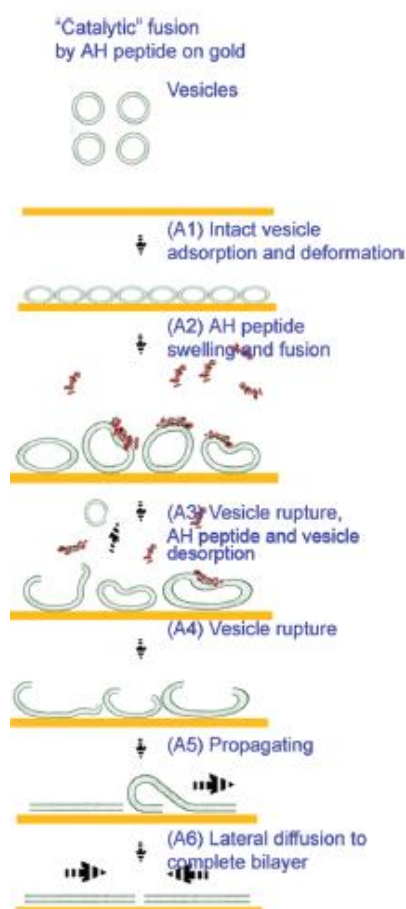


Figure 28 : Mécanisme possible de la formation d'une bicouche lipidique sur or en utilisant l'alpha peptide⁷⁶

- Le pH

Le pH de la solution tampon peut également avoir son importance. Ainsi une bicouche plane fluide zwitterionique peut être formée par auto-assemblage sur une surface par simple modification du pH. Pour provoquer la fusion de liposomes, il suffit le plus souvent d'abaisser le pH. En guise d'illustration il a été mis en évidence sur une surface de TiO₂ une fusion de liposomes induite par un changement de pH de 7,5 à 3,5⁶².

- La composition des liposomes

Les liposomes peuvent être composés de molécules lipidiques chargées (positivement, négativement) ou non. Selon les molécules lipidiques choisies l'adsorption et la rupture de liposomes diffèrent. Des études menées par Richter et coll.⁷⁷ ont montré des différences significatives selon la charge des liposomes modifiant les interactions entre le support solide et la bicouche lipidique (Figure 29). Dans le cas de liposomes chargés positivement (1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane : DOTAP), ils s'adsorbent et se rompent individuellement jusqu'à ce que le support soit complètement recouvert d'une bicouche lipidique supportée, pour laquelle la valeur caractéristique de variation de fréquence de -25 Hz en QCM-D est retrouvée. Dans le cas contraire, pour des liposomes fortement chargés négativement (50% DOPC/ 50% DOPS), aucune rupture n'est observée après l'adsorption sur la surface. En revanche, une rupture de liposomes est constatée avec un pourcentage plus faible de liposome chargé négativement (80% DOPC /20% DOPS)⁷⁷.

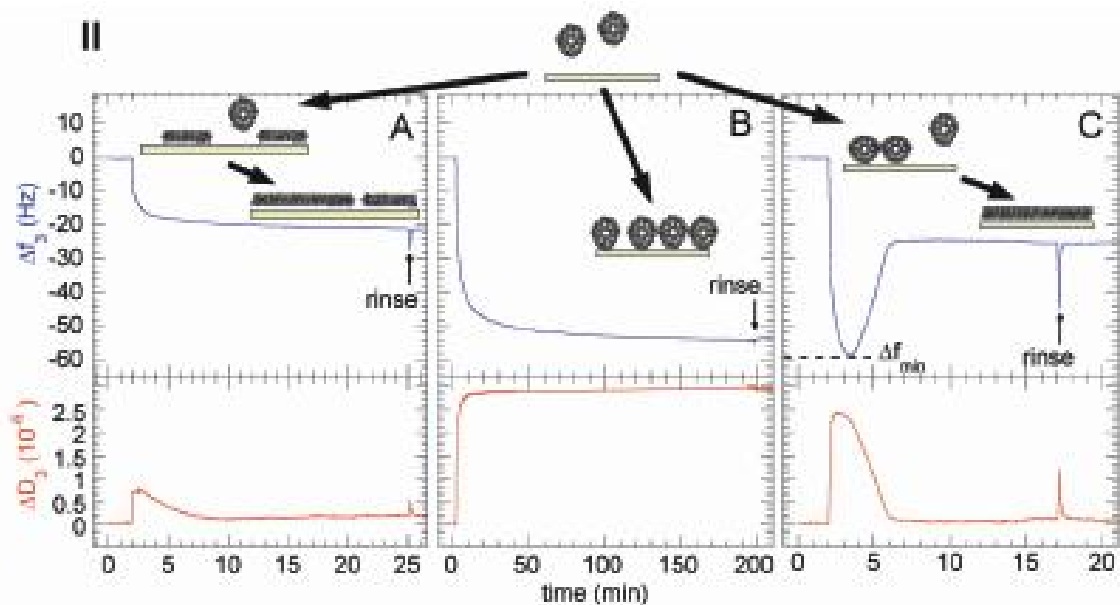


Figure 29 : Adsorption de vésicules de différentes compositions suivie par QCM-D. A) DOTAP, B) 50% DOPC 50% DOPS, C) 80% DOPC 20% DOPS⁷⁷.

Les bicouches lipidiques supportées (SLBs) de diverses compositions sur de nombreux supports ont été développées et bien caractérisées. Elles sont utilisées comme modèles simplifiés de membranes biologiques.

3.2.2.2. Les bicouches lipidiques espacées et ancrées (tBLMs)

Malgré l'utilisation fréquente de SLBs due principalement à leur robustesse et au maintien de la fluidité, deux inconvénients majeurs des SLBs sont observés. 1) Leur faible espacement entre le support et la membrane compris entre 1 et 2 nm qui limite fortement l'insertion de protéines intégrales⁷⁸. 2) Ce faible espace entre la surface et la bicouche lipidique nuit aux mesures électrochimiques car seulement un nombre limité d'ions peut être transporté vers l'électrode à travers la membrane⁴³.

Cette limitation a nécessité le développement de nouveaux types de bicouches lipidiques. Dans un premier temps des bicouches hybrides SAM/lipides ont été mises au point (Figure 30), ces bicouches ne répondent pas au besoin d'espacement de la bicouche de la surface puisqu'ils comportent un faible compartiment aqueux de 1 à 2 nm en dessous de la membrane. Ces bicouches hybrides ont permis de mettre au point de nouvelles stratégies de formation de membranes lipidiques planes. Il en résulte des bicouches lipidiques ancrées, espacées de la surface, possédant un réservoir aqueux plus important et mimant certaines des propriétés fondamentales de membranes cellulaires naturelles (fluidité, isolement électrique, insertion de protéines intégrales)⁷⁹. Ce type de membranes biomimétiques présente l'avantage d'augmenter la stabilité des bicouches à plus ou moins long terme (allant de la journée à plusieurs mois).

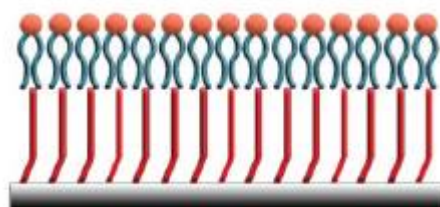


Figure 30 : Schéma représentant une bicouche hybride SAM/lipides⁷⁹.

Plusieurs alternatives de bicouches lipidiques espacées ont été développées, chacune présentant leurs avantages et inconvénients selon l'application biotechnologique à laquelle ils sont destinés (domaine de la santé, suivi environnemental, stockage d'énergie)⁷⁹. Certaines vont privilégier l'utilisation de couches s'intercalant entre le substrat et la bicouche lipidique (dites « coussin »), d'autres l'utilisation d'espaceurs moléculaires pouvant posséder une extrémité lipidique ainsi qu'une extrémité moléculaire permettant l'ancrage sur une surface adaptée, d'autres des alternatives plus inhabituelles comme les peptides ou encore les protéines⁴⁸.

3.2.2.2.1. *Bicouches sur coussins de polymères*

Les bicouches lipidiques sur « coussin » sont formées sur des couches de macromolécules ancrées à un support solide. Cette catégorie de bicouche lipidique n'est pas à proprement parler une bicouche lipidique « ancrée » mais plutôt supportée sur un coussin souple de polymères qui est lui ancré au support (Figure 31). La distance entre le support et la bicouche peut être de plusieurs nanomètres et est donc suffisante pour l'intégration de protéines membranaires⁷⁹. Les macromolécules espaceurs utilisées peuvent être des chaînes de polymères, des couches de polyélectrolytes, des carbohydrates, des peptides. La macromolécule choisie doit répondre à de nombreux critères importants. Parmi ceux-ci, la membrane lipidique supportée sur « coussin » doit être thermodynamiquement et mécaniquement stable. De plus, le polymère doit être hydrophile et relativement inerte chimiquement afin de ne pas causer de réactions annexes non souhaitées⁴⁶.

Les méthodes pour préparer les supports avec polymères incluent soit le greffage de polymères directement sur la surface (cellulose, dextran, ...), soit leur dépôt par centrifugation (« spin coating »), soit leur dépôt par trempage séquentiel.

La bicouche lipidique est déposée par Langmuir-Blodgett, Langmuir-Schaëffer, un système hybride monocouche / fusion de liposomes ou par fusion de liposomes sur le « coussin »⁴⁶.

Plusieurs types de substrats peuvent être utilisés : SiO_2 , phosphate de zirconium, or. Il est à noter que l'or est le substrat le plus souvent choisi pour sa fonctionnalisation facile et bien connue de la surface via des liaisons covalentes Au-S. De plus, l'or présente l'avantage d'être un substrat facilitant l'utilisation de nombreuses techniques de caractérisations telles que la microbalance à quartz et à dissipation (QCM-D), la résonance plasmonique de surface (SPR), les méthodes électrochimiques.

Nous aborderons plusieurs exemples de polysaccharides et de polyélectrolytes pouvant être utilisés comme « coussin ».

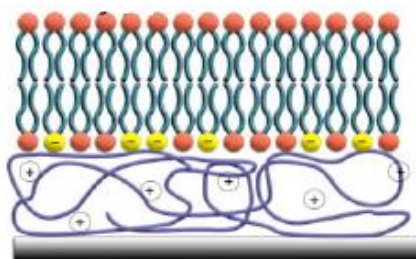


Figure 31: Schéma représentatif d'une « coussin » de polymères⁷⁹.

L'une des familles de macromolécules utilisées pour former des « coussins » est celle des **polysaccharides**. Ce sont des polymères d'oses reliés entre eux par des liaisons osidiques. Parmi ceux-ci les plus répandus sont :

- La **cellulose**, polysaccharide hydrophile inerte formé à partir de dextrose déshydraté. Elle est naturellement présente dans les cellules de plantes. Une variété de dérivés de la cellulose existe tel que le triméthylsilylcellulose (TMSC) ou l'isopentylcellulosecinnamate (IPCC)^{46,80}. Ce polysaccharide peut être arrangé en couches fines avec une épaisseur flexible ajustable servant de support de bicouche lipidique. Les films ainsi formés sont des isolants électriques permettant la génération de surfaces électrolyte/isolant/semiconducteur (EIS). Les bicouches lipidiques constituées sur ce type de polymère montrent une haute fluidité et autorise donc la reconstitution de canaux ioniques actifs comme la gramicidine⁸⁰.

- L'**agarose**, qui est un polymère simple, très communément trouvé dans l'agar, substance gélatineuse utilisée pour la culture de bactéries. Il est utilisé comme un support de bicouche lipidique depuis une quinzaine d'années^{46,81}. L'agarose permet d'obtenir des bicouches lipidiques sur support polymères possédant des propriétés électriques comparables à celles des membranes lipidiques suspendues⁸¹.

- Le **chitosan**, polysaccharide, est une alternative à l'utilisation d'agarose. Par l'utilisation de la microscopie à fluorescence, il a été montré que les membranes lipidiques formées sur des films fins de chitosan ont une stabilité importante⁸¹.

- Le **dextran** qui est un polysaccharide de poids moléculaire élevé. Il peut être couplé de façon covalente au verre et à des surfaces de Si/SiO₂ par fonctionnalisation époxysilane ou par fonctionnalisation photoréactive de la surface solide. Les coussins de polymères de ce type peuvent être caractérisés par de nombreuses techniques (RICM³⁹, ellipsométrie, FRAP, mesures d'angles de contact)⁸².

Des **polyélectrolytes** peuvent également être employés. Ce sont des polymères chargés possédant soit des charges positives soit des charges négatives⁴⁶. Le dépôt de polyélectrolytes se fait par couches successives. Le substrat est trempé dans 2 solutions de polyélectrolytes (polycationiques, polyanioniques). La couche de polycations peut être composée de chlorure de poly(dialkyldiméthylammonium), la couche de polyanions peut être composée d'acide sulfonique de poly(4-vinyl-benzène). Cette méthode de dépôt couche par couche est peu coûteuse, facile à mettre en œuvre et permet un bon contrôle de l'épaisseur⁴⁶.

L'un des polyélectrolytes les plus utilisés est le polycation appelé **polyéthylène imine (PEI)** : Ce polyélectrolyte peut être déposé sur plusieurs types de support (quartz⁸³, mica⁸⁴,...). Il peut être utilisé en multicouches couplé au « poly(4-styrenesulfonated) sodium salt » (PSS)

ou au « chlorure de poly(allylamine) » (PAH). Ces multicouches permettent de reproduire les propriétés des membranes (fluidité latérale et recouvrement de la surface membranaire), tout en respectant les forces d'interaction entre la membrane chargée et le support⁸⁵.

Nous pouvons également citer d'autres polymères comme le **polyacrylamide** et l'**Acide Poly-L Lactique (PLLA)**. Le **polyacrylamide** est un polymère utilisé classiquement en biologie pour former des gels d'électrophorèse. Pour être utilisé comme « coussin », ce polymère requiert que le support solide soit recouvert avec un agent de liaison tel un alkylsilane permettant de former une liaison covalente du polymère avec le verre⁴⁶. Quant au **Poly-L Lactic Acid (PLLA)**, c'est un polymère hydrophile et assez inerte présentant toutes les caractéristiques d'un support adapté pour des études biologiques⁴⁶.

3.2.2.2. *Bicouches lipidiques espacées et ancrées*

Les coussins de polymères présentent l'avantage de pouvoir mimer la matrice extracellulaire. En revanche, ces membranes ne possèdent pas en général de propriétés électriques isolantes suffisantes pour une caractérisation quantitative des activités des canaux ioniques⁷⁹. Pour des applications biotechnologiques qui nécessitent une mesure de conductivité ionique, un autre type de membrane lipidique espacée devra être choisie (Figure 32).

La fabrication des tBLMs se fait le plus souvent en deux étapes, formation d'une monocouche auto-assemblée suivie de la formation de la bicouche, mais la formation de la tBLM peut se faire aussi directement par fusion de vésicules⁹.

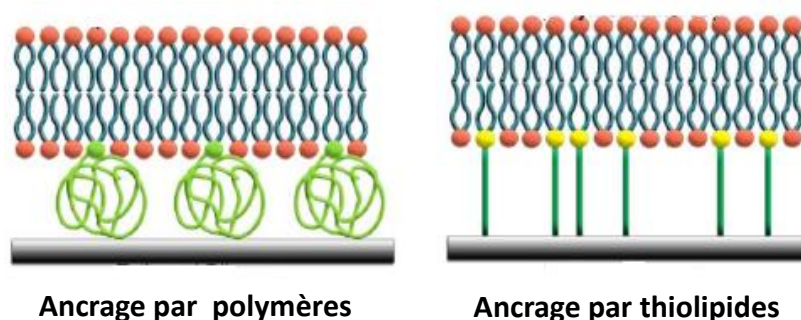


Figure 32 : Schéma de différentes tBLM⁷⁹.

Les molécules permettant d'ancrer des bicouches lipidiques espacées à une surface peuvent être réparties en plusieurs catégories : les thiolipides, les lipopolymères, les peptides et les protéines.

- Les **thiolipides** sont des éléments combinant un groupement thiol, un espaceur macromoléculaire et une extrémité phospholipidique. Le groupement thiol permet une immobilisation covalente de l'espaceur sur une surface d'or⁴⁶. La grande majorité des travaux de la littérature ont été réalisés avec des espaceurs oligo éthylène glycol. Parmi les différents lipides de cette classe, nous pouvons citer le « tetra-ethylene-oxy » espaceur et ancreur aux supports solides par 2 liaisons métal-souffre (DPTL)^{79,86} (Figure 33) et l'« hexa ethylene oxy » espaceur qui utilise une liaison métal-souffre pour l'immobilisation (DPHT)⁷⁹. Les tBLMs ainsi formées sont très résistantes.

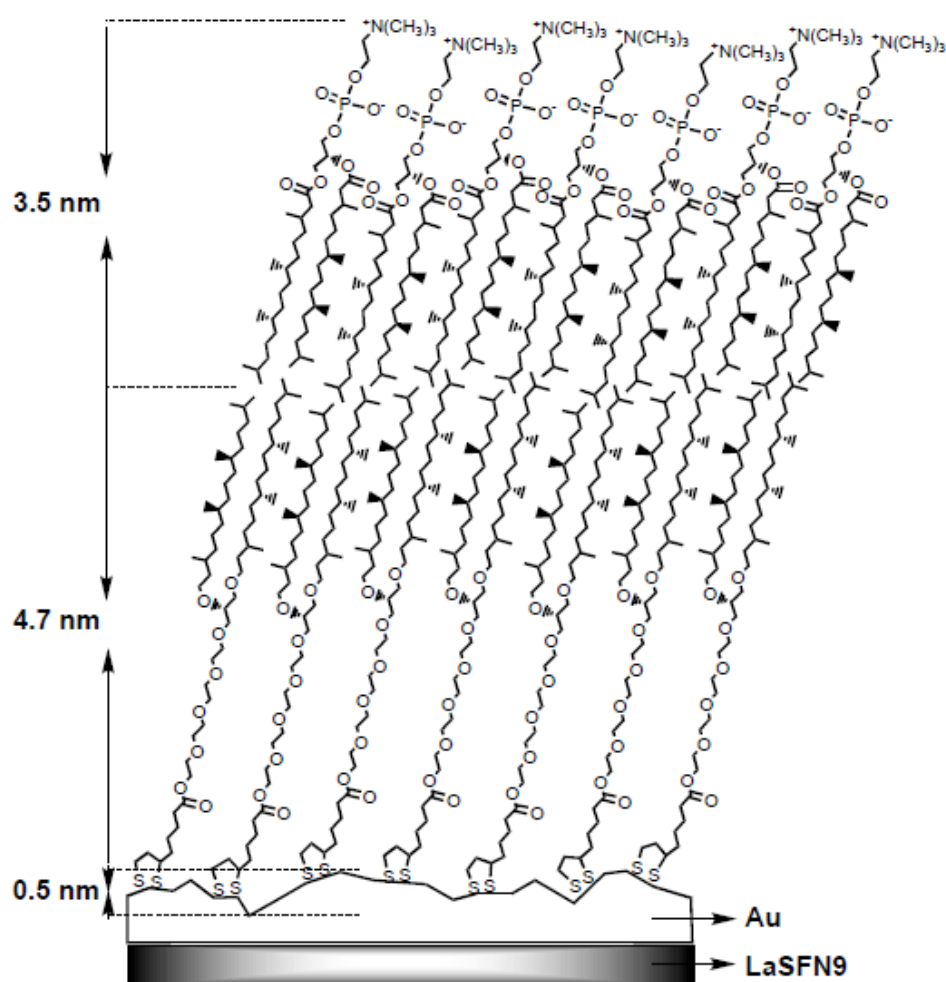


Figure 33 : Structure chimique du DPTL (2,3-di-O-phytanyl-sn-glycerol-1-tetraethylene glycol-d,l-a-lipoic acid ester lipid)⁸⁶.

L'utilisation de thiolipides pour la formation d'une tBLM sur des surfaces métalliques conductrices telles que l'or permet de faire des mesures électriques en convertissant les signaux biologiques en signaux électriques, le support solide servant d'électrode. Ceci permet la mesure de conductivité ionique et donc l'étude des canaux ioniques ou pores membranaires⁷⁹. Quelques rares études utilisent des molécules proches des thiolipides pour former des tBLMs sur d'autres surfaces comme le SiO₂. Pour cela, le groupement fonctionnel thiol est remplacé par un autre groupement chimique silane^{51,79,87}.

- Les **lipopolymères** ancreurs sont des polymères possédant une structure lipidique en fin de chaîne. Cette partie lipidique permet l'insertion de la molécule dans une bicouche lipidique. Afin d'obtenir un recouvrement total de la bicouche lipidique, l'autre extrémité du polymère doit avoir un domaine réactif permettant la liaison covalente à la surface plane. Sans ce point d'ancrage, les polymères ont naturellement tendance à se positionner dans la couche supérieure de la bicouche lipidique, ce qui empêche la formation d'une bicouche lipidique espacée⁴⁶. Plusieurs lipopolymères peuvent être choisis, ils doivent avoir les mêmes propriétés que celles décrites pour les coussins de polymères. Il peut s'agir du **Poly (2-Methyl-2-Oxazoline) PMOXA** qui est hydrophile, induit la répulsion de protéines et de nature non ionique. Le PMOXA peut aussi être modifié durant sa synthèse pour inclure des groupes terminaux pour l'accrochage sur support⁴⁶.

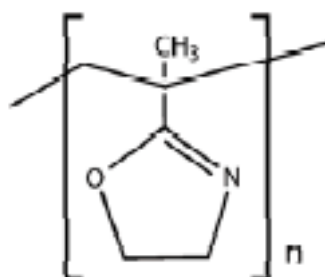


Figure 34 : Structure chimique du PMOXA (Poly (2-Methyl-2-Oxazoline))⁴⁶.

Le polyéthylène glycol est un polyéther qui peut être linéaire ou branché et qui porte soit de faibles charges, soit aucune. Il n'est pas toxique et présente d'excellentes caractéristiques de mouillage. Les groupements hydroxyle de la molécule de PEG lui permettent de se lier *via* des liaisons hydrogène à un grand nombre de groupes terminaux (amides, esters et aldéhydes). Pour son utilisation dans des bicouches lipidiques, le PEG doit être fonctionnalisé et les groupes réactifs différents requis usuellement sont les : amine, maléimide, disulfure, acides carboxyliques⁴⁶. L'espacement entre le support et la bicouche lipidique peut être modulé en modifiant la densité et la masse moléculaire du PEG incorporé dans les bicouches lipidiques.

- Les **Peptide BLM** sont une alternative à l'utilisation des espaceurs macromoléculaires ancreurs (peptBLM). A l'origine ces bicouches lipidiques peptidiques ont été préparées sur des billes de polymères avant d'être utilisées sur des surfaces d'or planes.

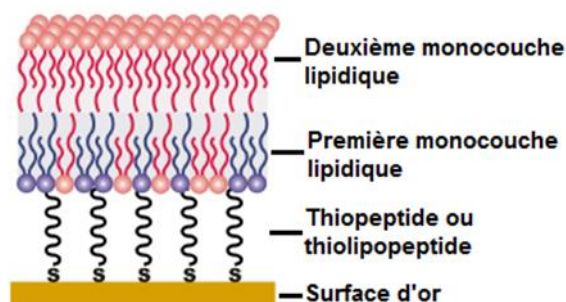


Figure 35 : Schéma d'une bicouche lipidique espacée peptidique (peptBLM)⁸⁸.

Le peptide est attaché à un substrat d'or grâce à des liaisons covalentes S-Au. Pour cela, les monocouches auto-assemblées (SAM) sont préparées à partir de thiopeptides ou thiolipoptides hydrophiles possédant un groupement sulfate terminal se liant de façon covalente à la surface d'or. L'autre extrémité du peptide (groupement carboxy terminal) est liée à une molécule lipidique tel le 1,2-ditétradecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DMPE) couramment utilisé. Une bicouche lipidique est ensuite formée par fusion de liposomes ou de protéoliposomes (avec des protéines incorporées dans les liposomes) (Figure 35). De nombreuses méthodes analytiques optiques et électrochimiques pourront être employées telles que la SPR, la Spectroscopie par fluorescence renforcée par champ de plasmon de surface (SFPS), la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), la CV (Cyclic Voltametry). Par exemple, à l'aide des techniques EIS, CV et SPR, l'incorporation de récepteurs acétylcholine nicotinique ou l' H^+ -ATPase de chloroplaste ont pu être montrés⁸⁹. L'avantage des peptBLM est de fournir un espaceur biocompatible très rigide présentant une couche aqueuse entre la membrane et le support suffisante pour l'incorporation de protéines mais également de préserver l'intégrité et la fonctionnalité des protéines membranaires complexes et issues de différentes espèces. En revanche, les systèmes ne sont pas très adaptés pour les mesures électrochimiques⁹⁰.

- Une autre alternative pour former une bicouche lipidique espacée de la surface est d'utiliser des protéines comme molécule d'ancrage. La stratégie de formation d'une **protéine BLM** (protBLM) a été développée par Geiss⁹¹ afin de pallier la capacité d'intégration limitée dans certaines tBLMs de certaines protéines membranaires, en particulier celles composées de larges sous-unités alors que pour l'insertion de certains peptides (melittine, gramicidine) les tBLMs suffisent⁹⁰. Le support solide est fonctionnalisé avec du N-Hydroxysuccinimide

(NHS) et les protéines sont étiquetées avec une poly-histidine, permettant leur immobilisation sur un support solide. La protéine est produite et solubilisée à l'aide de détergent. Ensuite, les molécules phospholipidiques remplacent les molécules de détergents à travers une dialyse *in situ* permettant la reconstitution d'une bicouche lipidique autour des protéines liées au substrat. Une protBLM est ainsi formée (Figure 36)^{79,90}.

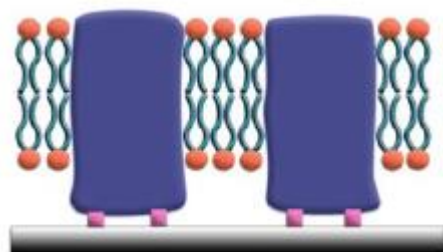


Figure 36 : Schéma représentatif d'une protBLM ⁷⁹

L'utilisation des protBLM permet d'immobiliser les protéines préalablement étiquetées dans une orientation définie. Par exemple, l'enzyme cytochrome c oxydase (CcO) peut être immobilisée avec le site liant le cytochrome c soit à la sous-unité I, soit à la sous-unité II (Figure 37)^{90,92}.

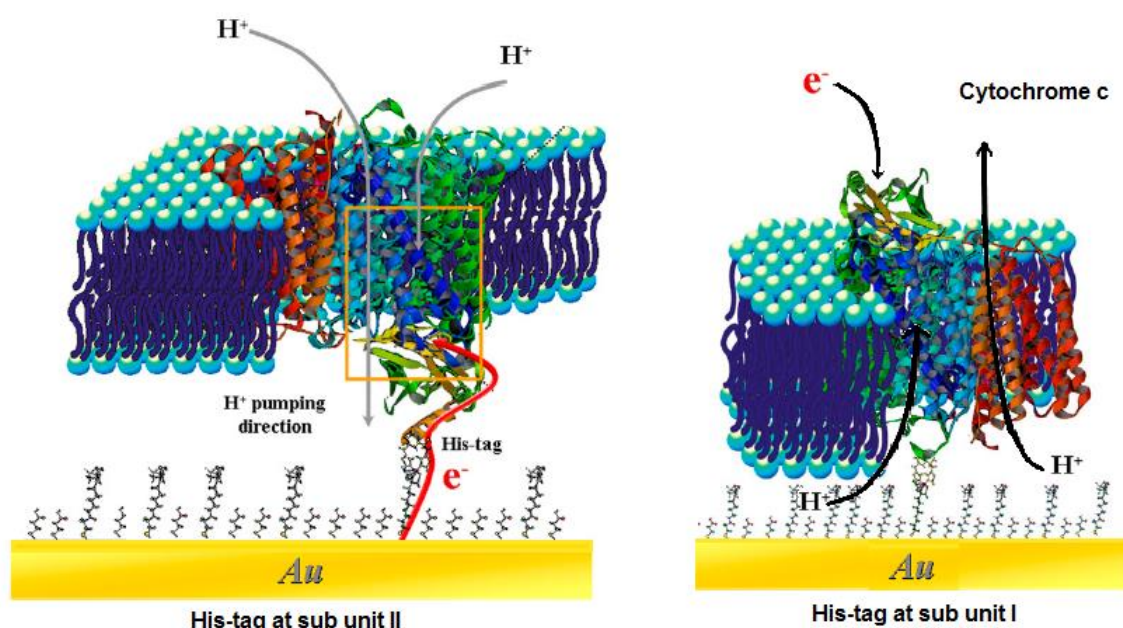


Figure 37 : Intégration de l'enzyme cytochrome oxydase c dans une protBLM. A gauche, immobilisation via la Sous-Unité II. A droite, immobilisation via la Sous-Unité I ^{90,93,94}.

Des techniques spectroscopiques et électrochimiques dont le SEIRAS (Surface Enhanced Infra Red Adsorption Spectroscopy) et SERRS (Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy) utilisées sous l'effet d'un champ électromagnétique défini mais également

l'EIS ou la CV peuvent servir à étudier les procédés de transfert de protons et d'électrons à travers les sites protéiques multi redox comme pour le CcO⁹⁰.

- Nous pouvons noter que d'autres systèmes peu habituels peuvent être utilisés, certaines tBLM sont notamment ancrées à l'aide de molécules d'ADN⁹⁵.

3.2.2.3. Les membranes suspendues

Les membranes suspendues sont des bicouches lipidiques formées à travers une ouverture entre deux environnements aqueux. Ces bicouches lipidiques sont accessibles des deux côtés. Ceci constitue le principal avantage de ces bicouches lipidiques. Il existe plusieurs approches pour les fabriquer. La plus utilisée et aussi la plus ancienne est la technique dite de « painting »⁴² dont l'explication a été donné précédemment (cf. 3.3.1.1)⁹.

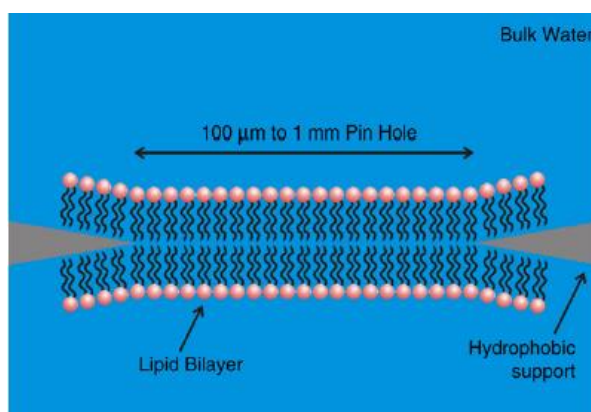


Figure 38 : Représentation schématique d'une membrane suspendue sur un trou formée dans un support hydrophobe. La membrane lipidique s'étend sur une surface comprise entre 100µ et 1mm³¹.

Les dispositifs peuvent être fabriqués avec du téflon ou même du polyméthacrylate de méthyle (PPMA) séparé par un film de parylène, la bicouche lipidique se formant sur l'ouverture (Figure 38)⁴¹. La conductivité de protéines insérées dans ces bicouches lipidiques peut être mesurée. Pour cela, un système d'électrodes, le plus souvent argent (Ag)/ chlorure d'argent (AgCl) dont l'une est située dans le compartiment situé au-dessus de la bicouche lipidique (la chambre) et l'autre dans le compartiment du dessous (le canal fluide)⁹⁶. Si un courant ionique est mesuré, la fonctionnalité des protéines membranaires insérées au sein de la bicouche lipidique peut être démontrée lorsqu'il s'agit de pores et de canaux membranaires tel l'OprM (protéine de la membrane externe de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*)⁹⁶, l'alpha-hémolysine^{97,98}.

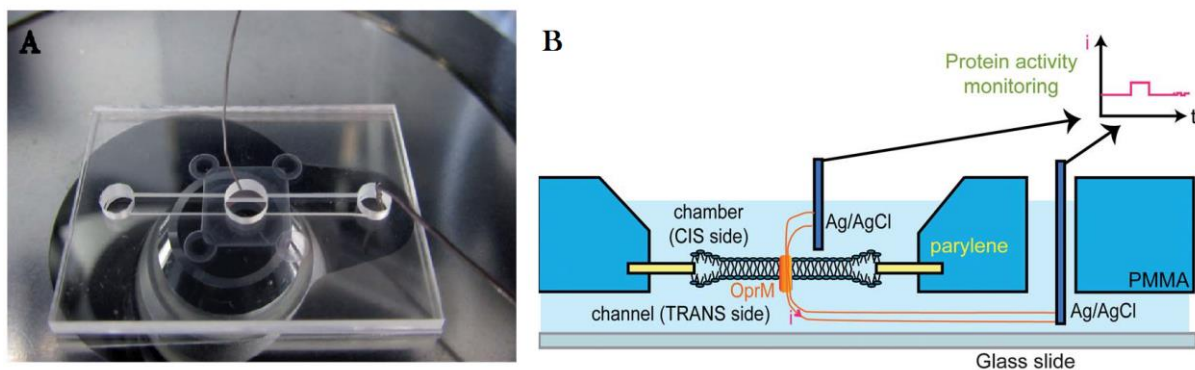


Figure 39 : Dispositif microfluidique utilisé pour la formation d'une bicouche lipidique suspendue. A) Vue au microscope du dispositif; C) Représentation schématique en coupe transversal d'un canal ionique reconstitué dans une bicouche lipidique suspendue et du suivi électrique à l'aide d'un amplificateur patch clamp⁹⁶.

Une alternative basée sur les travaux de l'équipe de Suzuki^{98,99,100} a permis la mise au point de dispositifs multi-puits. Ces dispositifs permettent l'enregistrement en parallèle de courants ioniques à travers les pores membranaires reconstitués sur des bicouches lipidiques planes formés avec la technique dite de « painting » (Figure 40).

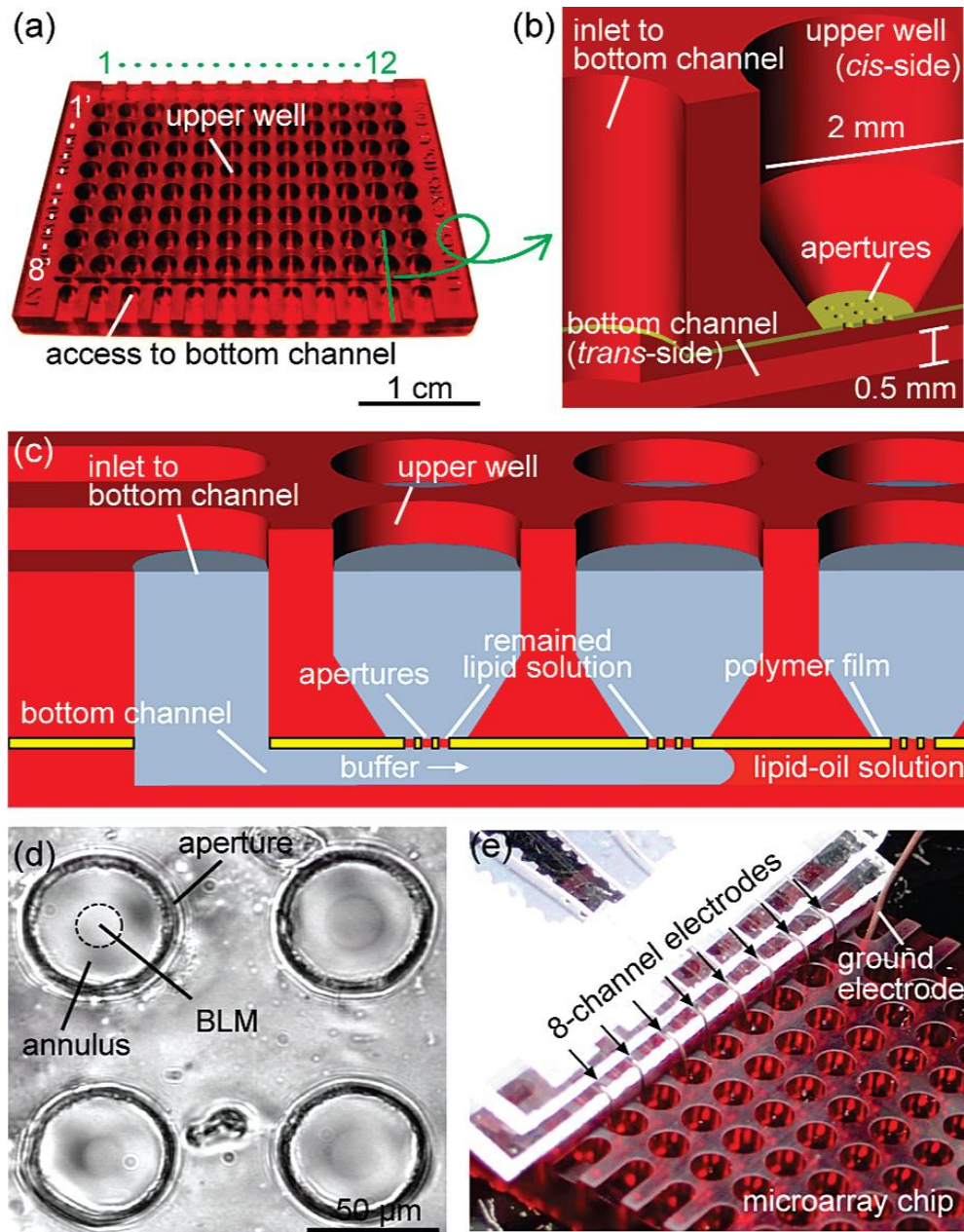


Figure 40 : Système de nanopores multicanaux. a) Vue globale du dispositif ; b,c) Coupes transversales du dispositif ; d) Images obtenues par microscopie des membranes suspendues formées sur 4 ouvertures obtenues ; e) Dispositif expérimental d'enregistrement multicanaux⁹⁸.

De nombreuses variantes existent utilisant de nouveaux matériaux et leurs propriétés. A titre d'illustration, une procédure proposée par Malmstadt et coll⁹⁷ permet la formation d'une bicouche lipidique suspendue par extraction de solvant dans un canal microfluidique par la mise en contact de la phase organique avec du Polydiméthylsiloxane (PDMS), matériau sélectivement adsorbant (Figure 41). Une fois le solvant évaporé, une bicouche lipidique contenue dans la phase aqueuse est obtenue⁹⁷.

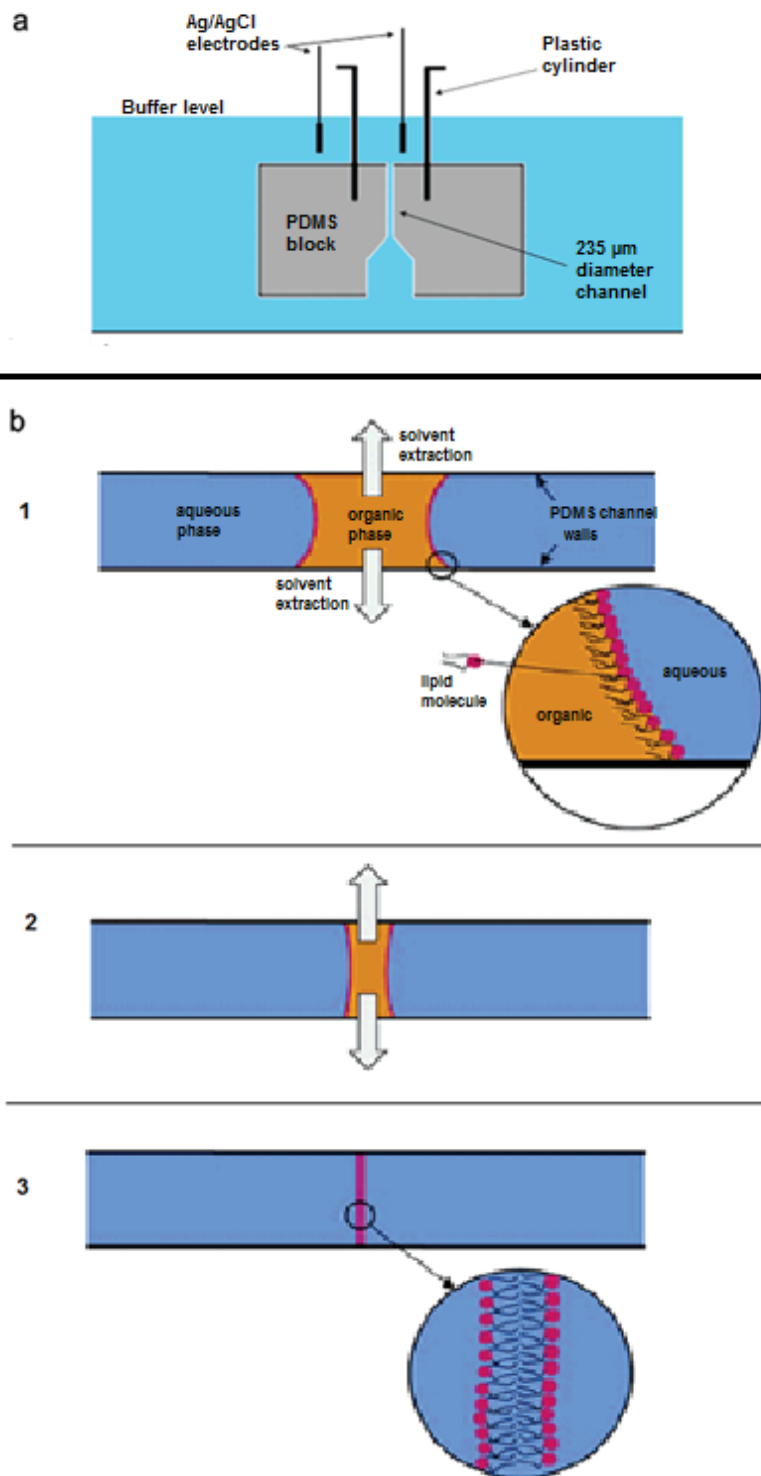


Figure 41 : Méthode de formation d'une bicouche phospholipidique par extraction de solvant dans un canal microfluidique. a) Représentation schématique en coupe transversale du dispositif. b) Mécanisme de formation de la bicouche lipidique ; 1) Une goutte de solvant organique et des lipides dissous est formée sous un flux aqueux ; 2) Le solvant pénètre dans le PDMS, les 2 interfaces se rapprochent ; 3) La bicouche lipidique est formée⁹⁷.

D'autres techniques basées sur la fabrication de micro/nano-pores structurés dans des matériaux comme l'oxyde de silicium ou le nitrure de silicium sont de plus en plus développées^{42,101}. Lors de l'utilisation de matériau conducteur du type silicium, la capacitance et le bruit sont amplifiés. Afin de les réduire, il est nécessaire d'oxyder la surface des matériaux¹⁰². La formation de bicouches lipidiques sur ces nanotrous utilisera préférentiellement les techniques couplées de Langmuir-Blodgett et Langmuir Schaëffer (ou fusion de liposomes pour la formation de la seconde monocouche lipidique) ou alors les techniques de fusion directe de liposomes dont la taille devra être adaptée aux dispositifs par le biais des méthodes que nous avons décrites précédemment (*cf.* 3.2.3). Néanmoins, cela n'empêche pas l'utilisation de la technique de Mueller-Montal (*cf.* 3.3.1.4) sur des surfaces de type silicium.

Il a été montré que l'utilisation de la technique de Montal-Mueller sur des pores de silicium a les mêmes propriétés que celles à travers les ouvertures en téflon en termes de capacitance, de conductance, de bruit et d'insertion de protéines. De plus, ces membranes suspendues présentent l'avantage d'être stables à plus hauts potentiels transmembranaires que les bicouches lipidiques formées dans le téflon (Figure 42).

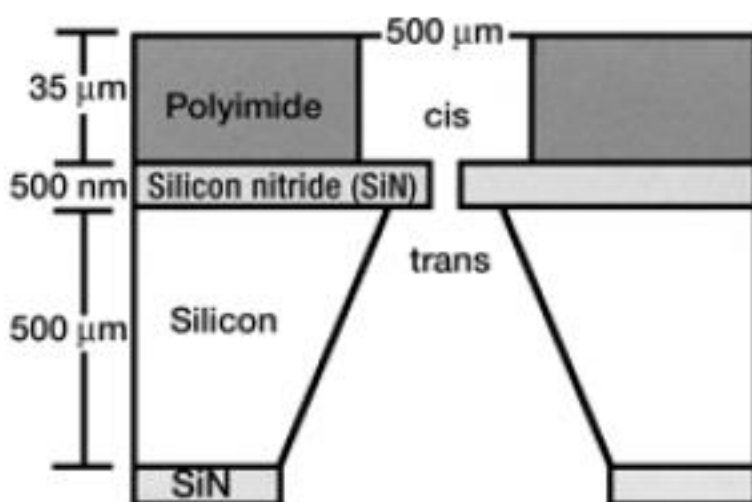


Figure 42 : Coupe transversale du dispositif sur lequel une bicouche lipidique peut être formée¹⁰².

Si la fusion directe de liposomes est requise pour la formation d'une bicouche lipidique, nous pouvons constater l'existence de plusieurs variantes selon la taille des pores. Si des SUVs ou des LUVs (petites ou larges vésicules) sont utilisées, les trous fabriqués pourront avoir un diamètre de l'ordre de la centaine de nanomètres sur une surface de silicium¹⁰³. A contrario, si des GUVs sont utilisées, des réseaux de trous auront une taille pouvant être comprise entre 0,6 µm et 8 µm¹⁰⁴. La condition commune à ces deux exemples

est la nécessité que la surface de silicium soit rendue suffisamment hydrophile (que ce soit par oxydation par voie chimique ou thermique) pour induire la fusion.

Dans le cadre de la formation de bicouches lipidiques par la technique de Langmuir-Blodgett, la taille des trous requise est moins critique. Des systèmes expérimentaux contenant des trous de taille comprise entre $0,3\ \mu\text{m}$ et $2\ \mu\text{m}$ formés sur SOI avec dépôt de nitrure de silicium peuvent être utilisés (Figure 43)^{105,106}.

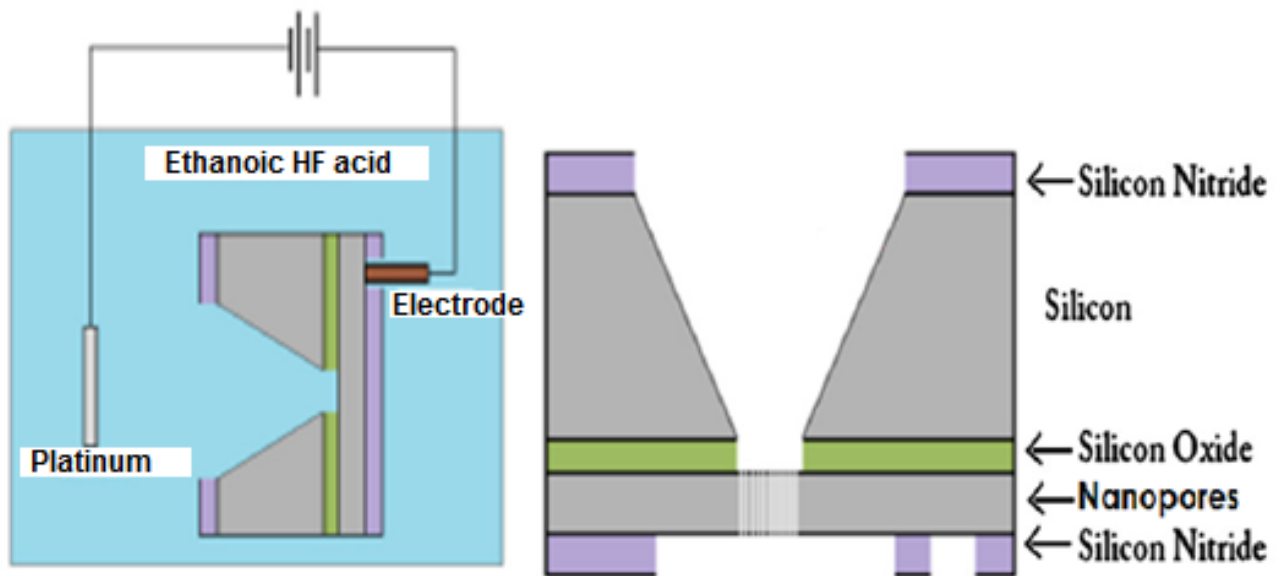


Figure 43 : Membrane de silicium poreux¹⁰⁵.

Une étude bibliographique des différentes bicouches lipidiques modèles (liposomes ou bicouches lipidiques planes) a été présentée. Dans le but d'étudier l'incorporation de protéines membranaires dans des membranes modèles, il nous faut nous intéresser aux différents modes de productions de protéines.

4. Reconstitution des protéines

4.1. Production classique de protéines recombinantes

Les protéines membranaires sont produites naturellement dans des cellules ou des microorganismes. L'utilisation de méthodes de génie génétique, permettant de cloner et de sur-exprimer des gènes codant pour des protéines d'intérêt, permet l'obtention de plus grandes quantités de protéines et facilite les étapes de purification notamment si une étiquette a été rajoutée à la protéine (par exemple His ou G₃T) en N ou C-terminal.

Le choix de l'hôte (cellule de mammifère, bactérie, levure, champignon, insecte) pour la production de protéines est important. Il est dépendant des modifications post-traductionnelles nécessaires à de nombreuses protéines membranaires. Les bactéries n'étant pas capables de faire ce type de modifications, le choix de cellules eucaryotes peut être préféré.

4.1.1. *Production de protéines recombinantes*

Les protéines recombinantes sont couramment produites dans des microorganismes (bactéries, levures) (Figure 44). Le gène codant pour la protéine d'intérêt est inséré dans un vecteur de clonage. Les vecteurs de clonages sont en général issus de molécules naturelles tels les plasmides de bactéries ou les bactériophages, les plasmides étant les plus fréquemment employés.

Le plasmide utilisé comme vecteur de clonage comporte une origine de réplication spécifique de l'hôte dans lequel sera inséré le fragment d'ADN, un gène de résistance (voire deux dans certains cas) à un antibiotique donné permettant la sélection des cellules contenant le plasmide et un site multiple de clonage (polylinker) reconnu par un certain nombre d'enzymes de restriction permettant d'ouvrir et de linéariser le plasmide circulaire.

La protéine est produite dans l'hôte lorsque les conditions sont établies pour induire l'expression du gène correspondant. Une fois produites, les protéines doivent être purifiées afin de pouvoir étudier leurs propriétés biochimiques et enzymatiques¹⁰⁷.

4.1.2. *Purification des protéines recombinantes*

Plusieurs étapes de purification sont en général nécessaires pour obtenir une protéine donnée. Le nombre d'étapes dépend de la protéine mais aussi du degré de purification souhaité. En effet, des protéines utilisées à des fins thérapeutiques ou en

cristallographie devront être extrêmement pures alors que pour l'étude cinétique d'une enzyme, un échantillon moins sélectif pourra être utilisé.

L'étape initiale de toute purification cellulaire est d'extraire les protéines des cellules qui les contiennent. Elle consiste à casser les cellules contenant les protéines d'intérêt à l'aide de méthodes de broyage telle que la sonication avec des billes de verre ou la filtration. Cette étape de broyage est suivie d'une centrifugation à basse vitesse pour récupérer l'extrait cellulaire total » comprenant membranes et partie soluble.

Les étapes suivantes sont dépendantes du type de protéines membranaires (intégrales ou périphériques) que l'on veut purifier. L'extraction est plus aisée dans le cas des **protéines périphériques** pour lesquelles les liaisons les reliant aux protéines intrinsèques ou aux lipides sont relativement faibles. Dans ce cas, une augmentation de la concentration ionique du tampon ou un changement de pH pourront par exemple être employés. Une fois cette extraction réalisée, les protéines extraites présentent les caractéristiques des protéines solubles, il est donc possible de les purifier avec des techniques de chromatographies conventionnelles adaptées à leurs propriétés (solubilité, charge, poids moléculaire, affinité, etc.).

Les **protéines intégrales**, quant à elles, nécessitent pour leur extraction des membranes l'utilisation de détergents afin de maintenir un environnement hydrophobe semblable à celui présent dans la membrane, tels que du sodium dodécyl sulfate (SDS), du sodium deoxycholate, du triton X-100. Une fois extraites elles pourront également être purifiées avec les mêmes techniques de chromatographies conventionnelles que celles utilisées pour les protéines périphériques. Néanmoins, dans leur cas, afin de maintenir la solubilité protéique, il est nécessaire d'inclure des détergents dans toutes les étapes du procédé de purification¹⁰⁷.

4.2. Système d'expression acellulaire

Lors de la production classique de protéines recombinantes, des problèmes de toxicité cellulaire peuvent survenir. S'ajoutent d'autres difficultés liées à leur structure complexe quand il s'agit de produire des protéines membranaires (faible rendement, agrégation protéique, mauvais repliement).

Grâce aux avancées en biochimie et biologie moléculaire, une alternative à la synthèse classique de protéines recombinantes existe (Figure 44). Il s'agit de systèmes de transcription et de traduction acellulaires qui vont directement permettre la production de protéines sans nécessiter la conservation de cellules et la croissance cellulaire. Ainsi, les systèmes d'expression acellulaire ne sont pas affectés par la physiologie des cellules vivantes. En outre, ils permettent un accès plus facile à l'étude de plusieurs mécanismes

cellulaires, de nombreux paramètres (concentrations de gènes, de polymérase, ...) pouvant être contrôlés.

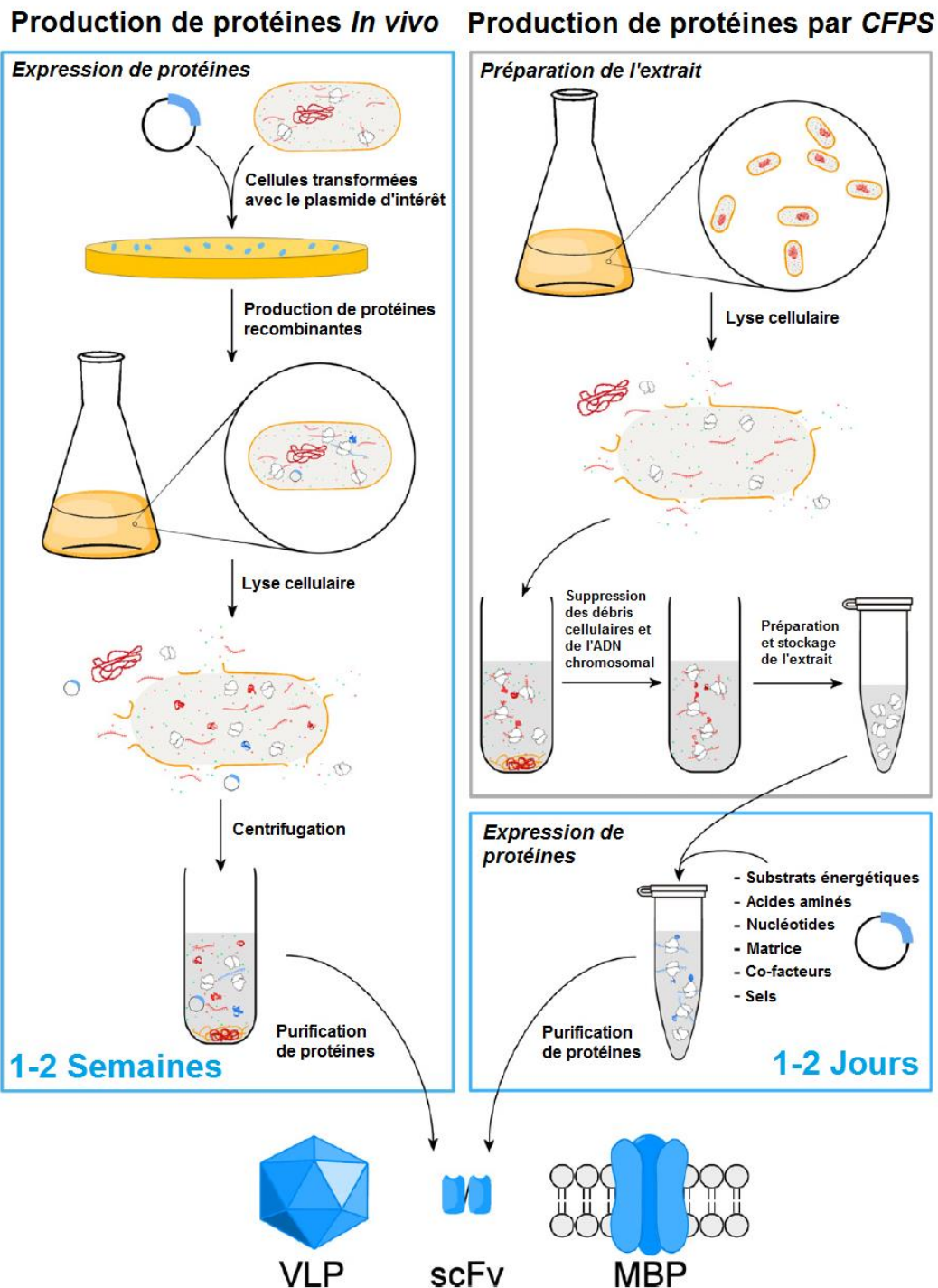


Figure 44 : Les deux modes de production de protéines. A gauche, système classique de production de protéines recombinantes. A droite, le système d'expression protéique acellulaire. Des exemples de protéines pouvant être produits avec ces systèmes sont indiqués (particule de type virus (VLP), un seul fragment de chaîne variable d'anticorps (scFv), et d'une protéine liée à la membrane (MBP))¹⁰⁸.

4.2.1. Principe du système d'expression acellulaire

Les premiers travaux sur la synthèse protéique remontent aux années 50. Dans les années 60, Nirenberg et Matthaei ont mis au point un système traductionnel acellulaire basé sur l'utilisation d'ARNm ou de polyribonucléotides synthétiques. Puis des systèmes couplant les étapes de transcription et de traduction à partir d'ADN ont été développés pour atteindre à la fin des années 80, la forme que nous connaissons aujourd'hui. Ce système d'expression protéique acellulaire (CFPS) basé sur l'utilisation d'extraits cellulaires a d'abord été utilisé pour la production de protéines solubles¹⁰⁹. Son utilisation s'est démocratisée dans les années 2000 avec la commercialisation des kits RTS par la société Roche. C'est un système dont le haut potentiel ne cesse d'être démontré. En effet, depuis les années 2000, la capacité de produire des protéines membranaires a été mise en évidence. Plus récemment, la possibilité de synthétiser entièrement le bactériophage T7 a été démontrée par l'équipe de V. Noireaux¹¹⁰. Ces systèmes dédiés à l'origine à une utilisation en laboratoire pour des raisons de coûts de production, peuvent depuis presque une décennie être utilisés en tant que plateforme de production de protéines à l'échelle industrielle^{111,108,112}.

Pour que les gènes soient exprimés, un système efficace *in vitro* pour les étapes de transcription d'ADN et de traduction d'ARNm est nécessaire. L'étape de traduction est la plus délicate puisqu'elle nécessite environ une centaine de composants (ribosomes, facteurs de traduction, ARNt, acides aminés, ATP, ...) et des conditions de réactions dépendantes de l'ajustement des paramètres tels que les concentrations de magnésium et de potassium.

Dans les systèmes d'expression protéique acellulaire, l'ADN sert de support de l'information génétique. Selon les équipes travaillant sur ces systèmes d'expression protéique, des différences peuvent être constatées. Certains systèmes utilisent des promoteurs T7, d'autres des promoteurs sigma 28. Les conditions expérimentales peuvent aussi varier. En guise d'illustration, des températures différentes peuvent être observées (29°C dans certains systèmes tandis que d'autres nécessitent une température de réaction de 37°C).

Plusieurs types de production sont utilisés : le mode batch et le mode en flux continu. La forme traditionnelle, mode batch, est le format de production le plus limité dans le temps. En effet, l'expression s'arrête au bout de quelques heures quand toutes les sources d'énergie nutritionnelles apportées en début de réaction ont été consommées, ceci a pour conséquence directe un rendement plus faible qu'un système en flux. Dans ce système, deux compartiments sont séparés par une membrane de dialyse de taille adaptée aux petites molécules. La solution tampon contient les substrats nutritionnels et énergétiques qui alimentent le compartiment dans lequel a lieu la réaction. Le système est donc supplémenté en énergie et en substrats. En outre, ce mode de production permet l'élimination des co-

produits de réaction qui sont des « déchets » métaboliques se retrouvant dans le compartiment d'alimentation¹¹³.

4.2.2. Les différents systèmes d'expression acellulaire

Plusieurs groupes de recherche à travers le monde travaillent sur le système d'expression protéique acellulaire avec des approches différentes. Les systèmes d'expression acellulaires pour la plupart sont basés sur des extraits cellulaires bruts. Une alternative basée sur l'utilisation de composants purifiés existe. Une brève description de ces systèmes d'expression protéique acellulaire est présentée ci-après.

4.2.2.1. Système d'expression alternatif (le système « Pure »)

Le système d'expression protéique acellulaire dit «PURE » (Protein synthesis Using Recombinant Element) comporte une machinerie de traduction reconstituée dont tous les composants notamment les aminoacyl ARNt synthétases, les facteurs de traduction (initiation, élongation, recyclage des ribosomes) sont produits et purifiés à partir de leur expression *in vivo* dans la bactérie *E. coli*. Les ribosomes, assurant la traduction de l'ARNm, sont isolés à partir d'un extrait d'*E. coli* mais avec un haut niveau de pureté obtenu après une centrifugation à 100 000 g¹¹⁴. En outre, tous les autres éléments nécessaires à la synthèse protéique sont ajoutés y compris le plasmide d'ADN portant le gène codant pour une protéine d'intérêt¹¹⁵.

Ces systèmes d'expression protéique sont commercialisés sous les appellations « PURESYSYSTEM® » par la société CosmoBio et « PURExpress® » par la société New England Biolabs.

Leur utilisation peut être privilégiée pour certaines études comme celles concernant les voies de repliement ou les cinétiques de traduction du fait de leurs nombreux avantages. En effet, la contamination due aux protéases, nucléases et phosphatases peut être réduite¹¹⁴. En outre, les facteurs de traduction peuvent être taggués (avec des tags poly-histidine), permettant de purifier facilement par ultrafiltration les protéines produites dans leur forme native (sans tag)¹¹⁶. En revanche, les rendements d'expression obtenus sont relativement plus faibles qu'avec les autres systèmes d'expression¹¹⁴.

4.2.2.2. Les différentes sources d'extraits bruts

Un autre système d'expression protéique acellulaire est basé sur « l'extrait » cellulaire brut. Ce qui est communément appelé « extrait » correspond à des extraits cytoplasmiques préparés à partir de cellules riches en ribosomes. Les plus répandus de ces systèmes sont commercialisés. Le système d'expression protéique le plus populaire est un

système procaryote basé sur un extrait issu de cellules d'*E.coli*. Ce système présente l'avantage de pouvoir être produit en grandes quantités dans un milieu de culture bas coût. Il permet d'obtenir de hauts rendements protéiques allant de la centaine de microgrammes par millilitre au milligramme par millilitre dans un système batch (non réalimenté) selon la protéine d'intérêt produite¹⁰⁸.

D'autres systèmes, essentiellement eucaryotes, sont couramment utilisés comme le germe de blé, les réticulocytes de lapins¹¹⁷ mais également les cellules d'insectes^{118,119}. Ces systèmes sont plus coûteux et les rendements protéiques obtenus sont plus faibles. Le choix de ces systèmes eucaryotes est souvent lié aux modifications post-traductionnelles nécessaires à la protéine d'intérêt produite mais également à l'usage de codons différents entre des systèmes bactériens ou eucaryotes.

Les avantages et inconvénients de ces trois systèmes eucaryotes ainsi que ceux du système bactérien *E. coli* sont résumés dans le Tableau 2¹⁰⁸.

Type	Avantages	Inconvénients
Extrait d'<i>E.coli</i>	1. Préparation de l'extrait simple et peu coûteuse 2. Haut rendement de synthèse protéique 3. Haut taux de synthèse protéique 4. Connaissances biochimiques clairement élucidées et outils bien établis pour les modifications génétiques 5. Source d'énergie bas coût 6. Capable de replier des protéines complexes	1. Modifications post-traductionnelles limitées
Extrait de germe de blé	1. Expression à large spectre de protéines eucaryotes a été atteinte à plusieurs reprises 2. Haut rendement de protéines complexes 3. Méthode sophistiquée à haut débit pour la protéomique	1. Faible rendement d'extraits obtenu à partir de cellules 2. Préparation de l'extrait très long et complexe 3. Outils de modifications génétiques faibles
Lysat de réticulocyte de lapin	1. Cassage des cellules facile et préparation rapide d'extrait 2. Modification post-traductionnelles spécifiques des eucaryotes	1. Manipulation complexe des tissus animaux requise 2. Spectre étroit de protéines exprimées 3. Bruit de fond élevé en ARNm de globine endogène et abondance de RNase M 4. Outils de modifications génétiques faibles 5. Faibles rendements de synthèse protéique
Extrait de cellules d'insectes	1. Cassage des cellules facile et préparation rapide d'extrait 2. Modifications post-traductionnelles spécifiques des eucaryotes 3. Traitement de la séquence signal	1. Culture cellulaire coûteuse et longue 2. Outils de modifications génétiques faibles

Tableau 2 : Comparaison de 4 différents systèmes d'expression protéique acellulaire¹⁰⁸.

4.2.3. Cas particulier des protéines membranaires

Comme indiqué précédemment, les systèmes d'expression protéique acellulaires ont dans un premier temps été utilisés pour produire des protéines solubles avant de montrer dans les années 2000 leur utilité pour la production des protéines membranaires. En effet, ces systèmes CFPS facilitent leur production du fait que l'environnement de l'hôte soit éliminé¹¹⁴.

Lorsque les protéines membranaires sont produites de façon standard (Precipitate cell free : P-CF), il se forme des précipités. L'environnement idéal pour produire des protéines membranaires n'est pas de former des précipités mais de travailler dans un environnement amphiphile utilisant des détergents ou des molécules lipidiques, point que nous aborderons dans la partie 4.3.

La principale difficulté rencontrée lors de la production de protéines membranaires vient de la nécessité du repliement correct de ces protéines, mais également de leurs modifications post-traductionnelles, dans le cas où les protéines en sont pourvues. Afin d'améliorer l'efficacité du repliement protéique permettant d'atteindre un état de conformation natif, des chaperonnes peuvent être ajoutées au milieu réactionnel¹¹⁵. Il a ainsi été montré que l'ajout de DnaK, DnaJ¹²⁰, GroEL, GroES purifiées peuvent être bénéfiques à certaines protéines. D'autres, en revanche, telle la luciférase, ne semblent pas nécessiter d'ajout de chaperonne^{113,121}.

Il a été montré la possibilité de réaliser avec ces systèmes d'expression protéique acellulaire de nombreuses modifications post-traductionnelles, notamment des glycosylations^{118,119}, des isoprénylations, des acétylations, des N-myristoylations, des phosphorylations.¹⁰⁸

Le besoin de produire des protéines membranaires avec de multiples ponts disulfure permettant la stabilisation de la structure de certaines protéines a été pendant longtemps une sérieuse limitation à l'utilisation des systèmes d'expression acellulaires. En effet, le milieu réactionnel est supplémenté en agents réducteurs. De nombreux progrès ont été réalisés afin de faciliter le repliement protéique. Depuis 2004, de nombreuses études ont permis de pallier ce problème¹²². En 2008, l'équipe de Swartz¹²³ a montré la possibilité de produire un complexe de 9 protéines, chacune contenant un pont disulfure¹²⁴. L'extrait utilisé requiert l'utilisation de faible concentration d'iodoacétamide (IAM) pour stabiliser l'environnement oxydant et de grandes quantités de vésicules membranaires disponibles.

Dans le cas de l'intégration directe de protéines membranaires dans des bicouches lipidiques, certains auteurs ont révélé qu'il n'y a pas de facteurs cytosoliques facilitant l'insertion autres que SRP (Signal Recognition Particle) et SecA requis pour l'intégration de protéines membranaires¹²⁵. Lors de la préparation des systèmes d'expression protéique acellulaire, de nombreux composants (y compris les facteurs cytosoliques) ne sont pas éliminés¹²³. Ceci explique qu'une grande partie des protéines membranaires produites par le CFPS ne nécessitent pas l'ajout de protéines cytoplasmiques de type Sec ou SRP. Néanmoins, lors de l'utilisation de système « PURE », dans lequel tous les composants ajoutés sont contrôlés, le système peut nécessiter une complémentation de ces facteurs facilitant l'insertion.

4.3. Intégration des protéines produites par CFPS dans des systèmes liposomes

Afin de synthétiser des protéines membranaires de conformation correcte, l'ajout d'un environnement amphiphile est souvent requis. Plusieurs stratégies ont été mises au point (Figure 45). Les protéines membranaires peuvent être synthétisées en présence de détergents aidant à leur solubilisation mais aussi en présence de molécules lipidiques synthétiques ou naturelles. Dans le cas de la présence de molécules lipidiques, des systèmes plus rares peuvent être utilisés comme les nanodisques¹⁰⁸ ou encore les vésicules phospholipidiques pouvant encapsuler les réactions de synthèse protéique acellulaire¹²⁶.

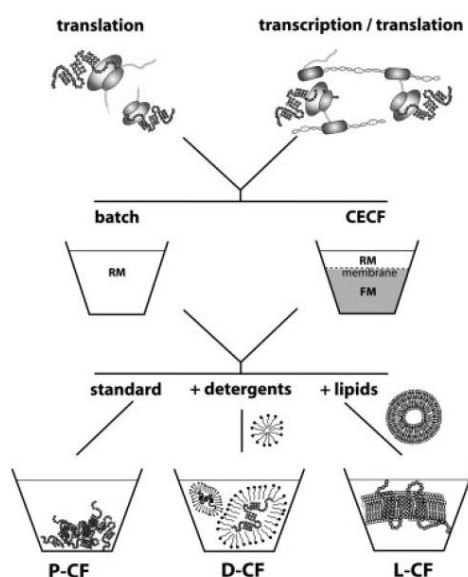


Figure 45 : Les différents systèmes de production par un système d'expression protéique acellulaire¹¹⁴.

4.3.1. Techniques utilisant des détergents

Afin de réduire la précipitation des protéines membranaires produites par le système d'expression acellulaire, des environnements amphiphiles artificiels peuvent être apportés directement dans le milieu réactionnel. Cet environnement amphiphile est très souvent généré grâce à l'ajout de détergents (Figure 45) permettant de former des protéomicelles. Les protéines membranaires pourront interagir avec les détergents durant l'étape de traduction ou peu de temps après cette étape *via* des interactions hydrophobes non spécifiques et ne requérant pas de machinerie de translocation¹²⁷.

Il est à noter que tous les détergents ne sont pas compatibles avec le système d'expression protéique acellulaire. En effet, certains détergents avec une haute concentration micellaire critique (CMC) comme l'Octyl beta Glucoside (β -OG) ou le 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) inhibent la transcription et

la traduction. En revanche, si la CMC des détergents est petite ils peuvent être tolérés, c'est le cas pour les dérivés polyoxyethylene-alkyl-ether (Brij), le Triton X-100, le n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) ou encore la digitonine (Tableau 3)^{114,125}. Toutefois, il existe de rares exceptions comme pour les protéines PomA et PomB de *Vibrio alginolyticus* qui sont exprimées en présence de CHAPS¹²⁸.

Abbr.	Long name	Final conc.	$\times$ CMC ^{a)}	Mode
Detergents				
LMPG	1-Myristoyl-2-hydroxy-sn-Glycerol-3-(phosphor-rac-(1-glycerol))	1%	420	P-CF
LPPG	1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-Glycerol-3-(phosphor-rac-(1-glycerol))	1%	n.a.	P-CF
DPC	Dodecylphosphocholine	1%	19	P-CF
SDS	Sodiumdodecylsulfate	1%	4.2	P-CF
Brij-35	Polyoxyethylene-(23)-lauryl-ether	0.1%	10.4	D-CF
Brij-58	Polyoxyethylene-(20)-cetyl-ether	1–1.5%	119–178	D-CF
Brij-78	Polyoxyethylene-(20)-stearyl-ether	0.5–1%	95–189	D-CF
Brij-98	Polyoxyethylene-(20)-oleyl-ether	0.2%	70	D-CF
Digitonin	Digitonin	0.4%	4.5	D-CF
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltoside	0.1%	15	D-CF
Triton X-100	PEG P-1,1,3,3-tetra-methyl-butylphenyl ether	0.2%	13.4	D-CF
diC ₈ PC	1,2-Dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0.1%	8.9	D-CF
Amphipols				
C ₆ F-TAC	C ₆ F ₁₃ C ₂ H ₄ -S-poly(tris(hydroxyl methyl)aminomethane)	2–18 mM	6.7–60	D-CF
C ₈ F-TAC	C ₈ F ₁₇ C ₂ H ₄ -S-poly(tris(hydroxyl methyl)aminomethane)	2–18 mM	67–600	D-CF
HF-TAC	C ₂ H ₅ C ₆ F ₁₂ C ₂ H ₄ -S-poly(tris(hydroxylmethyl)-aminomethane)	2–18 mM	4.5–40	D-CF
Lipids				
–	<i>E. coli</i> lipids	0.4%	–	L-CF
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0.4%	–	L-CF
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0.4%	–	L-CF
DSPC	1,2-Distaeroyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0.4%	–	L-CF
–	Giant liposomes: phosphatidyl-choline/DOPC/DMPC/cholesterol	5 mM	–	L-CF
–	<i>E. coli</i> inner membrane vesicles	0.06–0.08%	–	L-CF

Tableau 3 : Les environnements hydrophobes pour l'expression protéique acellulaire¹¹⁴.

4.3.2. Les différents systèmes lipidiques permettant l'intégration de protéines produites par CFPS

Les systèmes utilisant des molécules lipidiques vont de l'utilisation classique de liposomes aux membranes reconstituées en passant par des systèmes plus rares comme les nanodisques ou les microgouttes.

4.3.2.1. Les liposomes

Les liposomes, composés de lipides uniques, de mélanges de lipides ou même de fractions microsomaux (vésicules provenant des fragments de cellules lysées)¹¹⁴, sont le plus fréquemment utilisés.

Une orientation préférentielle des protéines peut être espérée lors de l'utilisation de ces liposomes puisque la machinerie de synthèse lipidique est seulement présente en dehors des vésicules¹¹⁴.

De nombreuses protéines ont ainsi pu être produites¹²⁹⁻¹³¹. Le repliement fonctionnel de certaines protéines a pu être montré. C'est le cas de la bactériorhodopsine intégrée dans la membrane après addition de liposomes artificiels de composition définie dans les extraits *E.coli*¹³².

4.3.2.2. Bioréacteurs vésiculaires

Il est également possible de créer un « réacteur artificiel » comprenant un génome synthétique composé de plusieurs gènes, encapsulé dans une vésicule lipidique. Ce système d'expression développé par V. Noireaux¹³³, permet également de caractériser la fonctionnalité des protéines membranaires. Le CFPS est encapsulé dans une vésicule¹²⁶. Pour cela, une émulsion est réalisée entre le système d'expression et de l'huile, les microgouttes de la solution d'expression protéique acellulaire étant stabilisées à l'aide d'une monocouche de phospholipides. Cette émulsion est placée au-dessus d'une solution dite d'alimentation, les vésicules y sont transférées, ceci formant au final une bicouche phospholipidique (Figure 46).

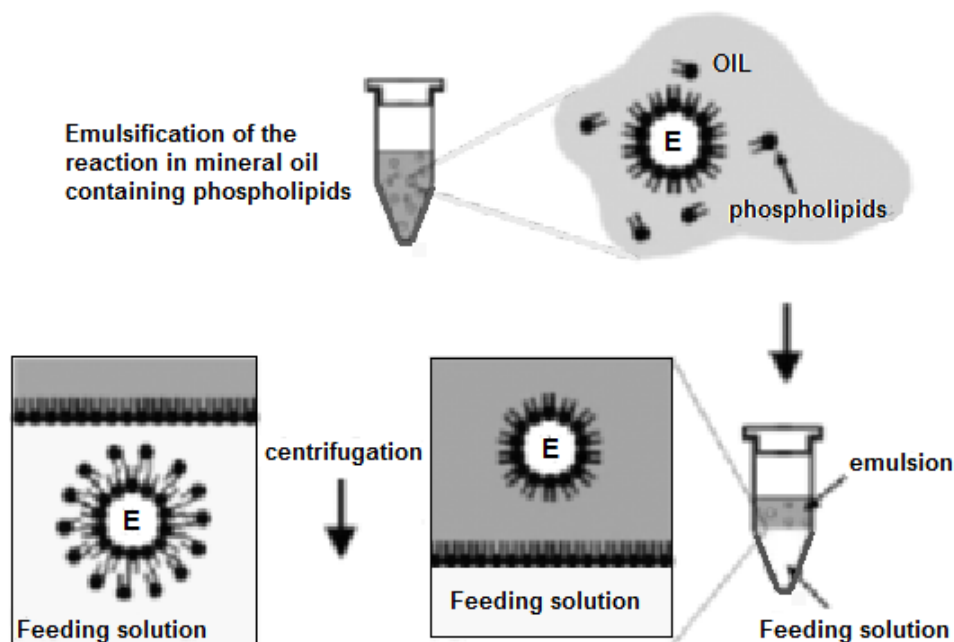


Figure 46 : Préparation d'un « réacteur artificiel ». Une émulsion est réalisée entre le système d'expression et de l'huile, les microgouttes de la solution d'expression protéique acellulaire étant stabilisées à l'aide d'une monocouche de phospholipides. L'émulsion est placée au-dessus d'une solution dite d'alimentation dans laquelle les vésicules sont transférées par centrifugation. Ceci permet l'encapsulation de CFPS dans une vésicule¹³⁴.

4.3.2.3. Les membranes lipidiques planes

De nouvelles stratégies permettant l'insertion directe des protéines membranaires dans des membranes lipidiques planes ont émergé ces dernières années. Cette alternative est toutefois moins fréquente que celle utilisant les liposomes décrite précédemment. Pour illustrer nos propos, nous pouvons citer deux exemples caractéristiques. Le premier, développé par l'équipe de Sinner (Figure 47), montre une incorporation d'un récepteur odorant OR5 faisant partie de la famille des GPCR (récepteurs couplés aux protéines G) dans une peptideBLM (peptBLM) caractérisée par la technique de *Spectroscopie par fluorescence à plasmons de surface (SPFS)*^{90,135}. Les auteurs ont également montré la possibilité d'insérer une autre protéine, la Cyt-bo₃⁸⁸. Pour cela, une peptBLM est formée par incubations successives d'un peptide alpha-laminine (P19), d'une solution lipidique pour former la première monocouche lipidique, d'une seconde solution lipidique pour former la seconde monocouche par fusion lipidique. Le système d'expression acellulaire est ensuite incubé sur cette peptBLM.

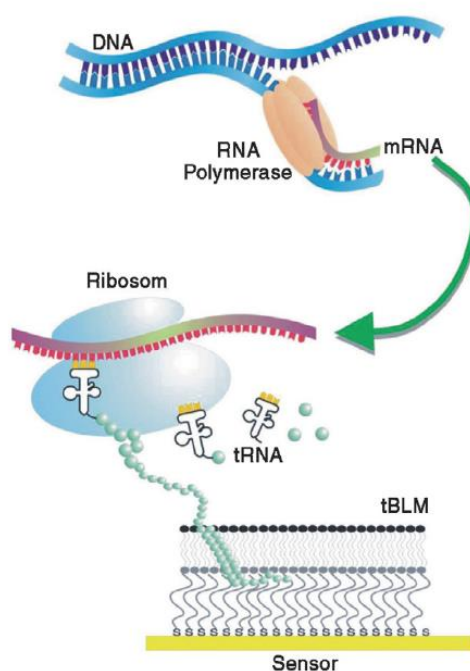


Figure 47 : Schéma représentatif du concept d'expression protéique acellulaire (CFPS) permettant la production de protéines membranaires ainsi que leur insertion immédiate dans une tBLM¹³⁶.

L'autre exemple n'utilise pas une peptBLM mais une bicouche lipidique supportée (SLB). La production de l'alpha hémolysine par le système d'expression protéique et son insertion directe dans une bicouche lipidique supportée par incubation du système réactionnel sur la bicouche lipidique (Figure 48) a été caractérisé à l'aide de la QCM-D par Chalmeau et al¹³⁷.

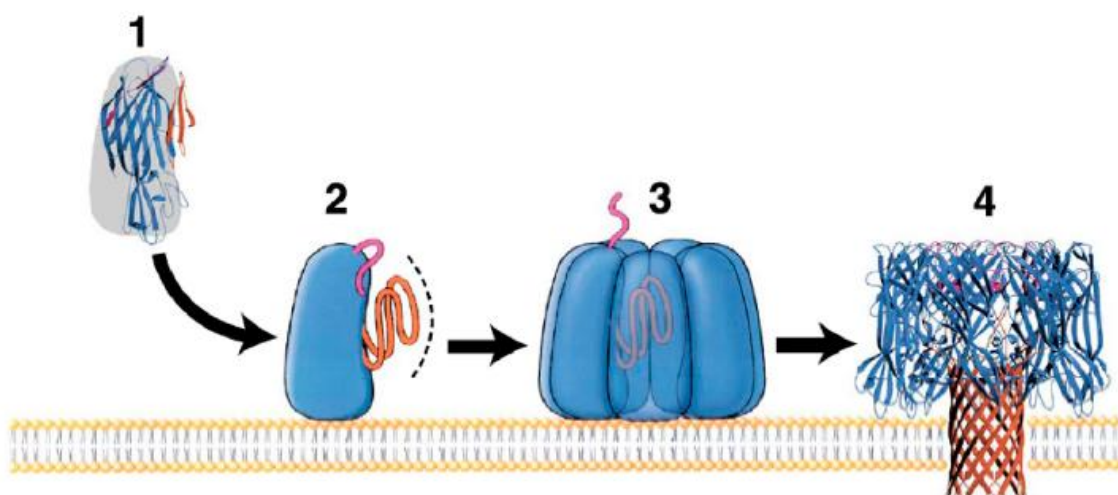


Figure 48 : Schéma représentatif de l'incorporation de l'alpha Hémolysine dans une bicouche lipidique supportée. 1) Formation du pore Alpha Hémolysine; 2) le monomère soluble interagit avec la bicouche ; 3) pour former un pré-pore composé de 7 monomères ; 4) avant la formation du pore à travers la membrane¹³⁸.

Ces insertions directes de protéines membranaires dans une bicouche lipidique plane, ouvrent le champ des applications possibles même si de nombreuses limitations, telles que la purification des protéines membranaires subsistent encore aujourd'hui.

4.3.2.4. Les microgouttes

Des travaux débutés au milieu des années 2000 ont laissé entrevoir une autre alternative à l'étude de protéines membranaires tout en permettant une miniaturisation des systèmes classiques de mesure de conductivité ionique.

Dans ce système, une microgoutte, pouvant être créée manuellement par pipetage d'une solution aqueuse dans l'huile ou par un système microfluidique, est immergée dans un mélange huile-lipides. Une monocouche lipidique auto-assemblée se forme alors spontanément autour de la microgoutte. Si deux microgouttes entourées chacune d'une monocouche lipidique sont amenées en contact l'une de l'autre, l'huile entre les monocouches se déplace et une bicouche lipidique se forme à l'interface.

Des protéines membranaires dispersées dans l'une des deux microgouttes permettent d'appliquer un potentiel et de mesurer le courant ionique passant à travers des canaux ou des pores membranaires intégrées à la bicouche lipidique (Figure 49)¹³⁹.

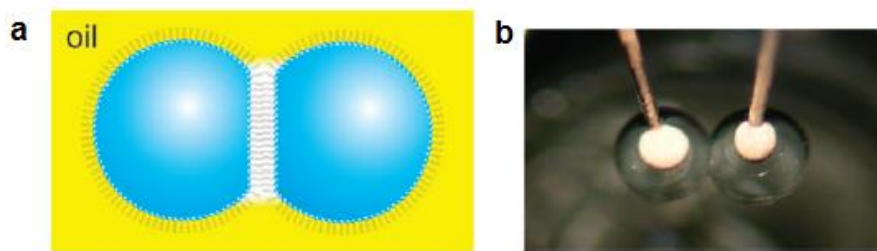


Figure 49 : Méthode de formation de bicouches lipidiques. a) monocouches lipidiques entre deux gouttes qui se lient spontanément entre elles quand elles sont amenées à proximité. b) Des électrodes peuvent être insérées dans les gouttes¹³⁹.

4.3.2.5. Les nanodisques

Une dernière alternative utilise des nanodisques constitués de bicouches lipidiques comportant entre 130 et 160 molécules lipidiques entourées d'une lipoprotéine hélicoïdale bipolaire¹⁴⁰. Dans le cas de l'intégration de protéines membranaires produites par le système d'expression acellulaire, les nanodisques doivent être ajoutés au milieu réactionnel. Cet ajout de nanodisques, préformés ou vides, fournit un environnement hydrophobe aux protéines membranaires sans inhiber les étapes de transcription et de traduction (Figure 50). Il a été montré que les nanodisques augmentent efficacement la solubilité de nombreuses protéines membranaires produites avec ce système.

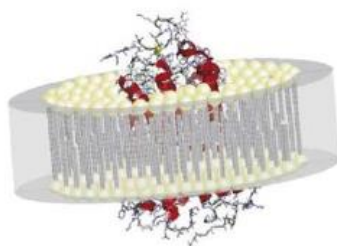


Figure 50 : Complexe formé entre un nanodisque et une protéine membranaire¹²⁵

5. Positionnement des travaux

L'état de l'art proposé montre l'intérêt de l'étude des protéines membranaires intégrales, l'un des deux composants des membranes biologiques avec les molécules lipidiques.

Pour l'étude de ces protéines membranaires, il nous a paru intéressant de construire un biocapteur comportant des protéines membranaires ayant pour objectif l'analyse fonctionnelle de ces protéines. Les applications de ces développements peuvent être d'ordre biomédicale et biotechnologique, comme celui du criblage de biomolécules, mais également plus fondamentale pour permettre une meilleure compréhension des processus biologiques telle que la transduction¹⁴¹⁻¹⁴³.

Pour cela, nous avons comme objectif de mettre au point l'insertion de protéines membranaires intégrales dans une membrane modèle biomimétique. Pour atteindre cet objectif, il nous faudra résoudre le problème de production et d'insertion des protéines membranaires. Nous pouvons entrevoir les difficultés rencontrées lors de la production de ces types de protéines. En effet, lors de la production classique de protéines membranaires recombinantes, des problèmes liés à leur structure complexe (besoin d'un repliement correct et parfois même de modifications post-traductionnelles), à leur faible rendement et à des problèmes de toxicité cellulaire peuvent survenir. La méthode proposée pour pallier ces difficultés est l'utilisation d'un système d'expression protéique acellulaire dont les avancées considérables au cours de la dernière décennie ont permis la production de protéines membranaires. Dans le cadre de la production de protéines membranaires par CFPS, l'utilisation d'un environnement hydrophobe (détergents, molécules lipidiques) est nécessaire pour obtenir une conformation correcte. Les molécules lipidiques choisies peuvent être apportées sous diverses formes (liposomes, nanodisques, bicouches lipidiques planes). Dans l'objectif de la mise au point de biocapteurs, les membranes biomimétiques de type bicouches lipidiques planes sont préférentiellement adoptées (*cf. partie III*). Leur utilisation combinée à celle du CFPS n'a été que très récemment dévoilée dans de rares travaux dont ceux de Chalmeau et coll.¹¹⁴. Dans un premier chapitre, d'une part, nous mettrons au point une bicouche lipidique supportée (SLB) sur une surface de SiO₂ dans laquelle des protéines membranaires seront incorporées. D'autre part, nous optimiserons les paramètres de production et d'incorporation de protéines produites par le CFPS sur une SLB. Certaines protéines nécessitant un espace plus important entre la surface et la bicouche lipidique, dans un second chapitre, nous mettrons au point une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM) par un procédé de fusion lipidique pour permettre l'incorporation de protéines membranaires. Dans un troisième chapitre, nous étudierons l'impact de la composition lipidique de la membrane modèle, que nous formerons, sur l'incorporation de protéines membranaires

intégrales. Enfin, dans un dernier chapitre, nous vérifierons la fonctionnalité de protéines membranaires produite par le CFPS dans une bicouche lipidique suspendue.

6. Références

1. Gorter, E. ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J. Exp. Med.* **41**, 439–443 (1925).
2. Danielli, J. F. & Davson, H. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.* **5**, 495–508 (1935).
3. ROBERTSON, J. D. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* **16**, 3–43 (1959).
4. Edidin, M. Timeline: Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414–418 (2003).
5. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731 (1972).
6. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry: 6th revised: international ed.* (W.H.FREEMAN & CO LTD, 2013).
7. Shechter, E. *Biochimie et biophysique des membranes: aspects structuraux et fonctionnels.* (Masson, 1997).
8. Luckey, M. *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations.* (Cambridge University Press, 2008).
9. Lahmani, M. *Les nanosciences.* (Belin, 2006).
10. Robert K. Murray, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, Anthony Weil. *Biochimie de Harper.*
11. Base de données sur les protéines de transport membranaire. at <<http://www.tcdb.org/>>
12. Lehninger, A. L. *Lehninger principles of biochemistry.* (W.H. Freeman, 2008).
13. Vincenot, F., Saleh, M. & Prévost, G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Francoph. Lab.* **2008**, 61–69 (2008).
14. Hildebrand, A., Pohl, M. & Bhakdi, S. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 17195–17200 (1991).
15. Czajkowsky, D. M., Sheng, S. & Shao, Z. Staphylococcal [alpha]-hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.* **276**, 325–330 (1998).
16. Gouaux, E. α -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An Archetype of β -Barrel, Channel-Forming Toxins. *J. Struct. Biol.* **121**, 110–122 (1998).
17. Song, L. *et al.* Structure of Staphylococcal alpha -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. *Science* **274**, 1859–1865 (1996).
18. Astier, Y., Braha, O. & Bayley, H. Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1705–1710 (2006).
19. Calamita, G. The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.* **37**, 254–262 (2000).
20. Stroud, R. M. *et al.* Selectivity and conductance among the glycerol and water conducting aquaporin family of channels. *FEBS Lett.* **555**, 79–84 (2003).
21. Savage, D. F., Egea, P. F., Robles-Colmenares, Y., Ili, J. D. O. & Stroud, R. M. Architecture and Selectivity in Aquaporins: 2.5 Å X-Ray Structure of Aquaporin Z. *PLoS Biol.* **1**, e2 (2003).
22. Ringler, P. *et al.* Structure of the water channel AqpZ from *Escherichia coli* revealed by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* **291**, 1181–1190 (1999).
23. Engel, A., Fujiyoshi, Y. & Agre, P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J.* **19**, 800–806 (2000).
24. Scheuring, S. High resolution AFM topographs of the *Escherichia coli* water channel aquaporin Z. *EMBO J.* **18**, 4981–4987 (1999).

25. Tang, C. Y., Zhao, Y., Wang, R., Hélix-Nielsen, C. & Fane, A. G. Desalination by biomimetic aquaporin membranes: Review of status and prospects. *Desalination* **308**, 34–40 (2013).
26. Lin, C.-M., Li, C.-S., Sheng, Y.-J., Wu, D. T. & Tsao, H.-K. Size-Dependent Properties of Small Unilamellar Vesicles Formed by Model Lipids. *Langmuir* **28**, 689–700 (2012).
27. Vemuri, S. & Rhodes, C. . Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.* **70**, 95–111 (1995).
28. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochimie*. (De Boeck, 2005).
29. Ohlsson, P.-Å., Tjärnhage, T., Herbai, E., Löfås, S. & Puu, G. Liposome and proteoliposome fusion onto solid substrates, studied using atomic force microscopy, quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance. Biological activities of incorporated components. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **38**, 137–148 (1995).
30. Rigaud, J.-L. & Lévy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* **372**, 65–86 (2003).
31. Castellana, E. T. & Cremer, P. S. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surf. Sci. Rep.* **61**, 429–444 (2006).
32. Yang, F. *et al.* Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: From bench to bedside. *Cancer Treat. Rev.* **37**, 633–642 (2011).
33. D D Lasic. The mechanism of vesicle formation. *Biochem J* **256**, 1–11 (1988).
34. Supaporn, S. Effect of Freeze-Thawing Process on the Size and Lamellarity of PEG-Lipid Liposomes. *Open Colloid Sci. J.* **4**, 1–8 (2011).
35. Dimitrov, D. S. & Angelova, M. I. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **253**, 323–336 (1988).
36. Fenz, S. F. & Sengupta, K. Giant vesicles as cell models. *Integr. Biol.* **4**, 982 (2012).
37. Diguët, A., Le Berre, M., Chen, Y. & Baigl, D. Preparation of Phospholipid Multilayer Patterns of Controlled Size and Thickness by Capillary Assembly on a Microstructured Substrate. *Small* **5**, 1661–1666 (2009).
38. Shum, H. C., Bandyopadhyay, A., Bose, S. & Weitz, D. A. Double Emulsion Droplets as Microreactors for Synthesis of Mesoporous Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* **21**, 5548–5555 (2009).
39. Limozin, L. & Sengupta, K. Quantitative Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) in Soft Matter and Cell Adhesion. *ChemPhysChem* **10**, 2752–2768 (2009).
40. Smith, A.-S., Sengupta, K., Goennenwein, S., Seifert, U. & Sackmann, E. Force-induced growth of adhesion domains is controlled by receptor mobility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6906–6911 (2008).
41. Kongsuphol, P., Fang, K. B. & Ding, Z. Lipid bilayer technologies in ion channel recordings and their potential in drug screening assay. *Sens. Actuators B Chem.* **185**, 530–542 (2013).
42. Zagnoni, M. Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab. Chip* **12**, 1026–1039 (2012).
43. Kaufman, Y. & Freger, V. in *Biomim.* (Pramatarova, L.) (InTech, 2011). at <<http://www.intechopen.com/books/on-biomimetics/supported-biomimetic-membranes-for-pressure-driven-water-purification>>
44. Peruchon, L. *et al.* Characterization of self-cleaning glasses using Langmuir–Blodgett technique to control thickness of stearic acid multilayers. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **197**, 170–176 (2008).
45. Blodgett, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1007–1022 (1935).
46. Cabe, I. P. M. Polymer Supported Lipid Bialyers. *Open J. Biophys.* **03**, 59–69 (2013).
47. Montal, M. & Mueller, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of their Electrical Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 3561–3566 (1972).
48. Richter, R. P. The Formation of Solid-Supported Lipid Membranes and Two-Dimensional Assembly of Proteins. A Study Combining Atomic Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. (2004).

49. Brian, A. A. & McConnell, H. M. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6159–6163 (1984).
50. Tamm, L. K. & McConnell, H. M. Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **47**, 105–113 (1985).
51. *Surface design: applications in bioscience and nanotechnology.* (Wiley-VCH, 2009).
52. Nollert, P., Kiefer, H. & Jähnig, F. Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces. *Biophys. J.* **69**, 1447–1455 (1995).
53. Cremer, P. S. & Boxer, S. G. Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J. Phys. Chem. B* **103**, 2554–2559 (1999).
54. Richter, R. P. & Brisson, A. R. Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. *Biophys. J.* **88**, 3422–3433 (2005).
55. Reviakine, I. & Brisson, A. Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **16**, 1806–1815 (2000).
56. Reimhult, E., Zäch, M., Höök, F. & Kasemo, B. A Multitechnique Study of Liposome Adsorption on Au and Lipid Bilayer Formation on SiO₂. *Langmuir* **22**, 3313–3319 (2006).
57. Reimhult, E., Hook, F. & Kasemo, B. Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size. *J. Chem. Phys.* **117**, 7401–7404 (2002).
58. Cho, N.-J., Frank, C. W., Kasemo, B. & Höök, F. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nat. Protoc.* **5**, 1096–1106 (2010).
59. Reimhult, E., Kasemo, B. & Höök, F. Rupture Pathway of Phosphatidylcholine Liposomes on Silicon Dioxide. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1683–1696 (2009).
60. Serro, A. P. *et al.* Formation of an intact liposome layer adsorbed on oxidized gold confirmed by three complementary techniques: QCM-D, AFM and confocal fluorescence microscopy. *Surf. Interface Anal.* **44**, 426–433 (2012).
61. Ekeröth, J., Konradsson, P. & Höök, F. Bivalent-Ion-Mediated Vesicle Adsorption and Controlled Supported Phospholipid Bilayer Formation on Molecular Phosphate and Sulfate Layers on Gold. *Langmuir* **18**, 7923–7929 (2002).
62. Cho, N.-J. & Frank, C. W. Fabrication of a Planar Zwitterionic Lipid Bilayer on Titanium Oxide. *Langmuir* **26**, 15706–15710 (2010).
63. Kumar, K. *et al.* Formation of supported lipid bilayers on indium tin oxide for dynamically-patterned membrane-functionalized microelectrode arrays. *Lab. Chip* **9**, 718 (2009).
64. Johnson, J. M., Ha, T., Chu, S. & Boxer, S. G. Early Steps of Supported Bilayer Formation Probed by Single Vesicle Fluorescence Assays. *Biophys. J.* **83**, 3371–3379 (2002).
65. Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P. & Kasemo, B. Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **84**, 5443 (2000).
66. Jackman, J. A., Cho, N.-J., Duran, R. S. & Frank, C. W. Interfacial Binding Dynamics of Bee Venom Phospholipase A₂ Investigated by Dynamic Light Scattering and Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir* **26**, 4103–4112 (2010).
67. Keller, C. A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* **75**, 1397–1402 (1998).
68. Rossetti, F. F., Bally, M., Michel, R., Textor, M. & Reviakine, I. Interactions between Titanium Dioxide and Phosphatidyl Serine-Containing Liposomes: Formation and Patterning of Supported Phospholipid Bilayers on the Surface of a Medically Relevant Material. *Langmuir* **21**, 6443–6450 (2005).
69. Rossetti, F. F., Textor, M. & Reviakine, I. Asymmetric Distribution of Phosphatidyl Serine in Supported Phospholipid Bilayers on Titanium Dioxide. *Langmuir* **22**, 3467–3473 (2006).
70. Seantier, B. & Kasemo, B. Influence of Mono- And Divalent Ions on the Formation of Supported Phospholipid Bilayers via Vesicle Adsorption. *Langmuir* **25**, 5767–5772 (2009).
71. Ye, Q., Konradi, R., Textor, M. & Reimhult, E. Liposomes Tethered to Omega-Functional PEG Brushes and Induced Formation of PEG Brush Supported Planar Lipid Bilayers. *Langmuir* **25**, 13534–13539 (2009).

72. Berquand, A. *et al.* Two-Step Formation of Streptavidin-Supported Lipid Bilayers by PEG-Triggered Vesicle Fusion. Fluorescence and Atomic Force Microscopy Characterization [†]. *Langmuir* **19**, 1700–1707 (2003).
73. Cho, N.-J., Cho, S.-J., Cheong, K. H., Glenn, J. S. & Frank, C. W. Employing an Amphipathic Viral Peptide to Create a Lipid Bilayer on Au and TiO₂. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10050–10051 (2007).
74. Cho, N.-J. *et al.* Mechanism of an Amphipathic α -Helical Peptide's Antiviral Activity Involves Size-Dependent Virus Particle Lysis. *ACS Chem Biol* **4**, 1061–1067 (2009).
75. Hardy, G. J. *et al.* Biomimetic supported lipid bilayers with high cholesterol content formed by α -helical peptide-induced vesicle fusion. *J. Mater. Chem.* **22**, 19506 (2012).
76. Cho, N.-J. *et al.* Alpha-Helical Peptide-Induced Vesicle Rupture Revealing New Insight into the Vesicle Fusion Process As Monitored *in Situ* by Quartz Crystal Microbalance-Dissipation and Reflectometry. *Anal. Chem.* **81**, 4752–4761 (2009).
77. Richter, R. P., Him, J. L. K. & Brisson, A. Supported lipid membranes. *Mater. Today* **6**, 32–37 (2003).
78. Bayerl, T. M. & Bloom, M. Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads. A new vesicular model system studied by ²H-nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* **58**, 357–362 (1990).
79. Jackman, J., Knoll, W. & Cho, N.-J. Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes. *Materials* **5**, 2637–2657 (2012).
80. Hillebrandt, H., Wiegand, G., Tanaka, M. & Sackmann, E. High Electric Resistance Polymer/Lipid Composite Films on Indium–Tin–Oxide Electrodes. *Langmuir* **15**, 8451–8459 (1999).
81. Baumgart, T. & Offenhäuser, A. Polysaccharide-Supported Planar Bilayer Lipid Model Membranes. *Langmuir* **19**, 1730–1737 (2003).
82. Elender, G., Kühner, M. & Sackmann, E. Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 565–577 (1996).
83. Wong, J. Y. *et al.* Polymer-Cushioned Bilayers. I. A Structural Study of Various Preparation Methods Using Neutron Reflectometry. *Biophys. J.* **77**, 1445–1457 (1999).
84. Wong, J. Y., Park, C. K., Seitz, M. & Israelachvili, J. Polymer-Cushioned Bilayers. II. An Investigation of Interaction Forces and Fusion Using the Surface Forces Apparatus. *Biophys. J.* **77**, 1458–1468 (1999).
85. Kügler, R. & Knoll, W. Polyelectrolyte-supported lipid membranes. *Bioelectrochemistry* **56**, 175–178 (2002).
86. Schiller, S. M., Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz, H. & Knoll, W. Archaea Analogue Thiolipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ultrasoft Gold Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 208–211 (2003).
87. Atanasov, V. *et al.* Membrane on a Chip: A Functional Tethered Lipid Bilayer Membrane on Silicon Oxide Surfaces. *Biophys. J.* **89**, 1780–1788 (2005).
88. Arslan Yildiz, A., Yildiz, U. H., Liedberg, B. & Sinner, E.-K. Biomimetic membrane platform: Fabrication, characterization and applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **103**, 510–516 (2013).
89. Naumann, R. *et al.* Proton transport through a peptide-tethered bilayer lipid membrane by the H⁺-ATP synthase from chloroplasts measured by impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 25–34 (2002).
90. Sinner, E.-K., Ritz, S., Naumann, R., Schiller, S. & Knoll, W. in **Volume 49**, 159–179 (Elsevier, 2009).
91. Giess, F., Friedrich, M. G., Heberle, J., Naumann, R. L. & Knoll, W. The Protein-Tethered Lipid Bilayer: A Novel Mimic of the Biological Membrane. *Biophys. J.* **87**, 3213–3220 (2004).
92. Naumann, R. *et al.* The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionally active form. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 651–662 (1999).

93. Friedrich, M. G., Robertson, J. W. F., Walz, D., Knoll, W. & Naumann, R. L. C. Electronic Wiring of a Multi-Redox Site Membrane Protein in a Biomimetic Surface Architecture. *Biophys. J.* **94**, 3698–3705 (2008).
94. Friedrich, M. G. *et al.* In Situ Monitoring of the Catalytic Activity of Cytochrome c Oxidase in a Biomimetic Architecture. *Biophys. J.* **95**, 1500–1510 (2008).
95. Chung, M. & Boxer, S. G. Stability of DNA-Tethered Lipid Membranes with Mobile Tethers. *Langmuir* **27**, 5492–5497 (2011).
96. Wang, W. *et al.* Activity monitoring of functional OprM using a biomimetic microfluidic device. *The Analyst* **137**, 847 (2012).
97. Malmstadt, N., Nash, M. A., Purnell, R. F. & Schmidt, J. J. Automated Formation of Lipid-Bilayer Membranes in a Microfluidic Device. *Nano Lett.* **6**, 1961–1965 (2006).
98. Osaki, T., Suzuki, H., Le Pioufle, B. & Takeuchi, S. Multichannel Simultaneous Measurements of Single-Molecule Translocation in α -Hemolysin Nanopore Array. *Anal. Chem.* **81**, 9866–9870 (2009).
99. Le Pioufle, B., Suzuki, H., Tabata, K. V., Noji, H. & Takeuchi, S. Lipid Bilayer Microarray for Parallel Recording of Transmembrane Ion Currents. *Anal. Chem.* **80**, 328–332 (2008).
100. Suzuki, H., Pioufle, B. L. & Takeuchi, S. Ninety-six-well planar lipid bilayer chip for ion channel recording Fabricated by hybrid stereolithography. *Biomed. Microdevices* **11**, 17–22 (2008).
101. Reimhult, E. & Kumar, K. Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports. *Trends Biotechnol.* **26**, 82–89 (2008).
102. Peterman, M. C. *et al.* Ion Channels and Lipid Bilayer Membranes Under High Potentials Using Microfabricated Apertures. *Biomed. Microdevices* **4**, 231–236 (2002).
103. Shinozaki, Y. *et al.* Visualization of Single Membrane Protein Structure in Stretched Lipid Bilayer Suspended over Nanowells. *Appl. Phys. Express* **3**, 027002 (2010).
104. Sumitomo, K., Tamba, Y., Shinozaki, Y. & Torimitsu, K. Confinement of Fluorescent Probes in Microwells on Si Substrates by Sealing with Lipid Bilayers. *Appl. Phys. Express* **3**, 107001 (2010).
105. Tantawi, K. H., Berdiev, B., Cerro, R. & Williams, J. D. Porous silicon membrane for investigation of transmembrane proteins. *Superlattices Microstruct.* **58**, 72–80 (2013).
106. Simon, A. *et al.* Formation and stability of a suspended biomimetic lipid bilayer on silicon submicrometer-sized pores. *J. Colloid Interface Sci.* **308**, 337–343 (2007).
107. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology.* (Cambridge University Press, 2009).
108. Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E. & Jewett, M. C. Cell-free protein synthesis: Applications come of age. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1185–1194 (2012).
109. Swartz, J. R. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 195–201 (2001).
110. Shin, J., Jardine, P. & Noireaux, V. Genome Replication, Synthesis, and Assembly of the Bacteriophage T7 in a Single Cell-Free Reaction. *ACS Synth. Biol.* **1**, 408–413 (2012).
111. Swartz, J. Developing cell-free biology for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 476–485 (2006).
112. Zawada, J. F. *et al.* Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production-a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 1570–1578 (2011).
113. Katzen, F., Chang, G. & Kudlicki, W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* **23**, 150–156 (2005).
114. Schwarz, D., Dötsch, V. & Bernhard, F. Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *PROTEOMICS* **8**, 3933–3946 (2008).
115. Whittaker, J. W. Cell-free protein synthesis: the state of the art. *Biotechnol. Lett.* **35**, 143–152 (2012).
116. Shimizu, Y. *et al.* Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* **19**, 751–755 (2001).

117. Craig, D., Howell, M. T., Gibbs, C. L., Hunt, T. & Jackson, R. J. Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic *in vitro* transcription-translation system. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4987–4995 (1992).
118. Tarui, H. *et al.* Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 446–453 (2001).
119. Katzen, F. & Kudlicki, W. Efficient generation of insect-based cell-free translation extracts active in glycosylation and signal sequence processing. *J. Biotechnol.* **125**, 194–197 (2006).
120. Vysokanov, A. V. Synthesis of chloramphenicol acetyltransferase in a coupled transcription-translation *in vitro* system lacking the chaperones DnaK and DnaJ. *FEBS Lett.* **375**, 211–214 (1995).
121. Kolb, V. A., Makeyev, E. V. & Spirin, A. S. Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system. *J. Biol. Chem.* **275**, 16597–16601 (2000).
122. Yin, G. & Swartz, J. R. Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 188–195 (2004).
123. Wu, J. & Swartz, J. High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 1237–1250 (2008).
124. Goerke, A. R. & Swartz, J. R. Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 351–367 (2008).
125. Katzen, F., Peterson, T. C. & Kudlicki, W. Membrane protein expression: no cells required. *Trends Biotechnol.* **27**, 455–460 (2009).
126. Noireaux, V. & Libchaber, A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17669–17674 (2004).
127. Berrier, C. *et al.* Cell-Free Synthesis of a Functional Ion Channel in the Absence of a Membrane and in the Presence of Detergent[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 12585–12591 (2004).
128. Terashima, H., Yoshizumi, R., Kojima, S. & Homma, M. Cell-free synthesis of the torque-generating membrane proteins, PomA and PomB, of the Na⁺-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J Biochem mvn110* (2008). doi:10.1093/jb/mvn110
129. Liguori, L., Marques, B., Villegas-Mendez, A., Rothe, R. & Lenormand, J.-L. Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. *J. Controlled Release* **126**, 217–227 (2008).
130. Liguori, L., Blesneac, I., Madern, D., Vivaudou, M. & Lenormand, J.-L. Single-step production of functional OEP24 proteoliposomes. *Protein Expr. Purif.* **69**, 106–111 (2010).
131. Varnier, A. *et al.* A Simple Method for the Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles. *J. Membr. Biol.* **233**, 85–92 (2010).
132. Kalmbach, R. *et al.* Functional Cell-free Synthesis of a Seven Helix Membrane Protein: In situ Insertion of Bacteriorhodopsin into Liposomes. *J. Mol. Biol.* **371**, 639–648 (2007).
133. Shin, J. & Noireaux, V. Efficient cell-free expression with the endogenous E. Coli RNA polymerase and sigma factor 70. *J. Biol. Eng.* **4**, 8 (2010).
134. Noireaux, V., Bar-Ziv, R., Godefroy, J., Salman, H. & Libchaber, A. Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles. *Phys. Biol.* **2**, P1–P8 (2005).
135. Robelek, R. *et al.* Incorporation of In Vitro Synthesized GPCR into a Tethered Artificial Lipid Membrane System. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 605–608 (2007).
136. Sinner, E.-K. *et al.* Molecularly controlled functional architectures. *Mater. Today* **13**, 46–55 (2010).
137. Chalmeau, J., Monina, N., Shin, J., Vieu, C. & Noireaux, V. [alpha]-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 271–278 (2011).
138. Noireaux, V., Maeda, Y. T. & Libchaber, A. Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 3473–3480 (2011).
139. Bayley, H. *et al.* Droplet interface bilayers. *Mol. Biosyst.* **4**, 1191 (2008).

140. Rajesh, S., Knowles, T. & Overduin, M. Production of membrane proteins without cells or detergents. *New Biotechnol.* **28**, 250–254 (2011).
141. Simpson, M. L. Cell-free synthetic biology: a bottom-up approach to discovery by design. *Mol. Syst. Biol.* **2**, (2006).
142. Schwille, P. Bottom-Up Synthetic Biology: Engineering in a Tinkerer's World. *Science* **333**, 1252–1254 (2011).
143. Dzieciol, A. J. & Mann, S. Designs for life: protocell models in the laboratory. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 79 (2012).

Partie II : Matériel et Méthodes

1. Préparation des plasmides

1.1. Souches et plasmides

1.1.1. Plasmides

Les plasmides utilisés ont été construits à partir du plasmide pBEST-Luc (Promega Corporation Madison, WI). Le facteur sigma 28 d'*E. coli* a été cloné sous un promoteur Lambda (plasmide pBEST-p15A-OR2-OR1-Pr-UTR1-Sigma28-T500). Les autres fragments d'ADN codant pour les protéines d'intérêt ont été clonés sous la dépendance d'un promoteur Ptar spécifique du facteur sigma 28 d'*E. coli*.

Les cartes plasmidiques des plasmides d'ADN utilisées dans nos travaux pour produire les protéines d'intérêt (Alpha-Hémolysine, Alpha-Hémolysine-eGFP et Aquaporine Z) ainsi que celle de sigma 28 sont répertoriées ci-après :

- Sigma 28

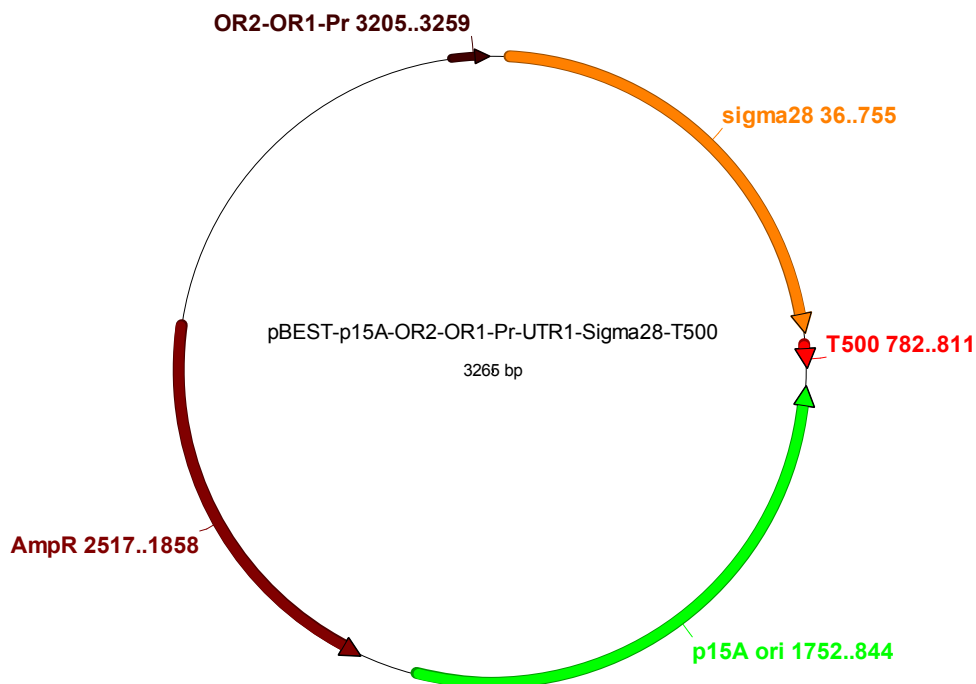


Figure 51 : Carte plasmidique de Sigma 28.

- Alpha Hémolysine (AH)

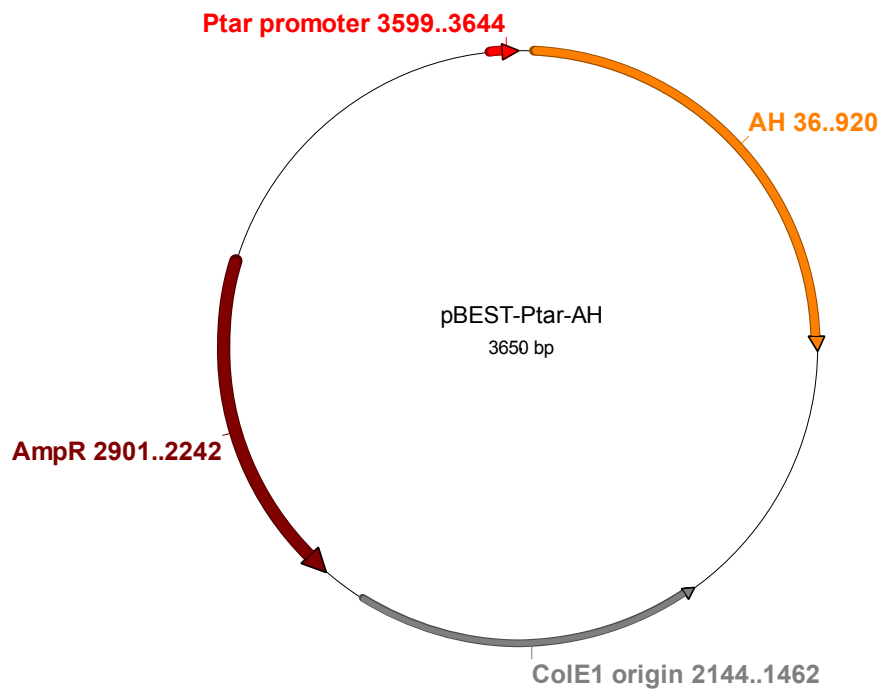


Figure 52 : Carte plasmidique de l'alpha hémolysine.

- Alpha Hémolysine-eGFP (AHeGFP)

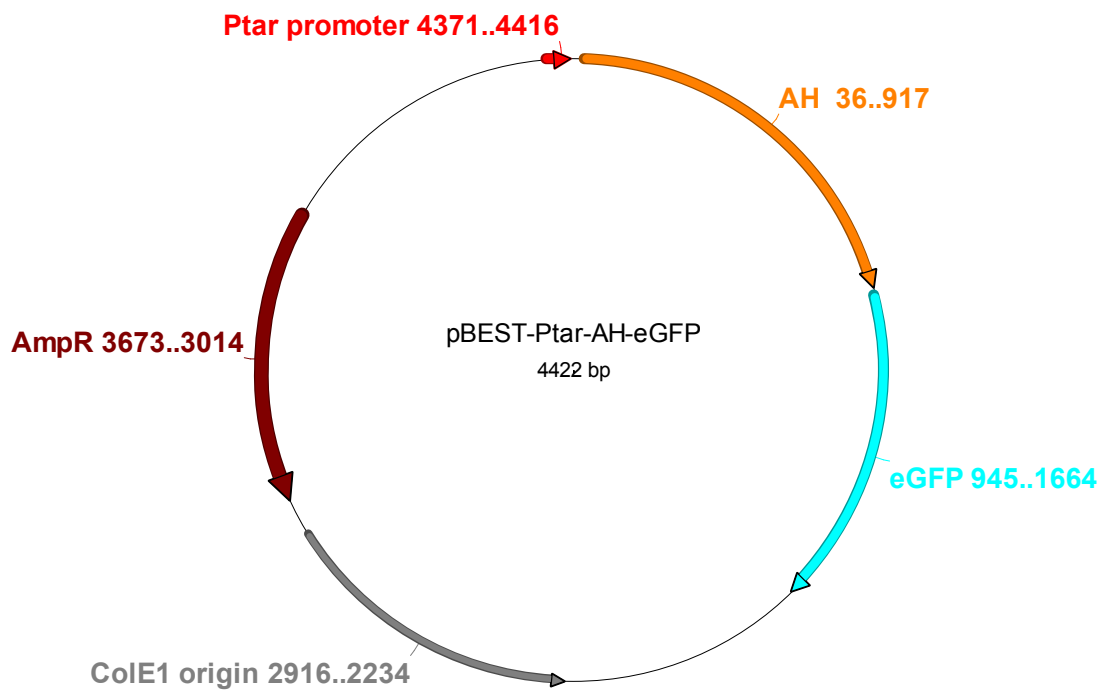


Figure 53 : Carte plasmidique de l'alpha hémolysine eGFP.

- Aquaporine Z (AqpZ)

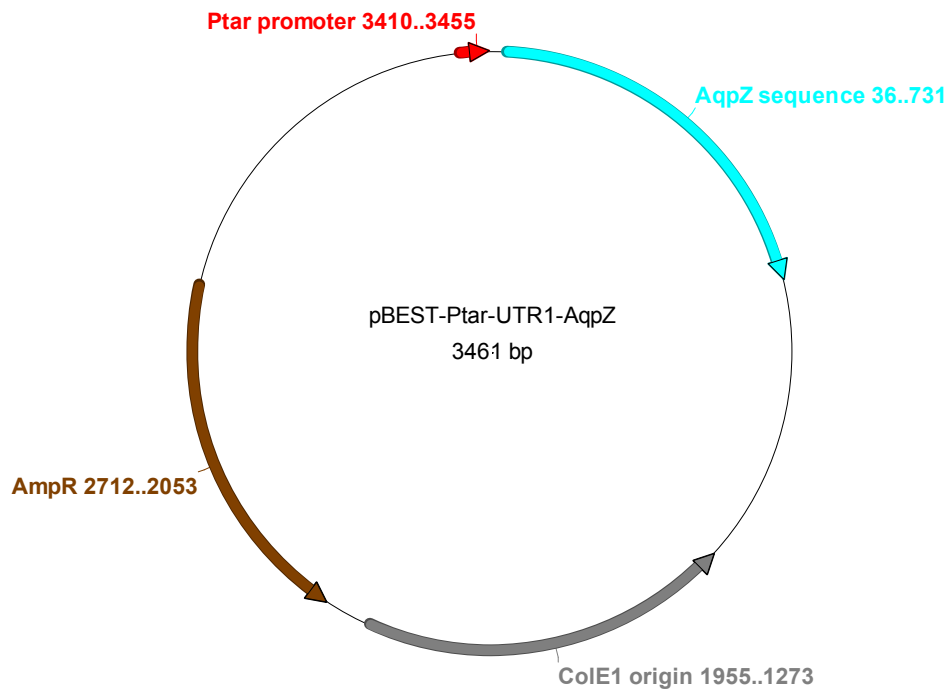


Figure 54 : Carte plasmidique de l'Aquaporine Z.

1.1.2. Souches

Les souches *E. coli* JM109 et KL740, rendues au préalable compétentes ont été utilisées dans le cadre de nos travaux. Le protocole utilisé pour la préparation des cellules compétentes est décrit ci-dessous.

- Protocole expérimental : préparation de cellules compétentes

Le protocole de préparation de cellules compétentes est basé sur celui décrit par Li et coll.¹

Au préalable, un tampon de transformation composé de 80 mM de CaCl_2 et de 15% de glycérol est préparé et autoclavé.

Des cellules JM109 (37°C) ou KL740 (29°C) sont mises en culture jusqu'à une densité optique mesurée à 600 nm comprise entre 0,35 et 0,45. Une heure avant le début de la préparation de cellules compétentes, le tampon et les tubes de centrifugation sont stockés dans de la glace. En outre, la température de la centrifugeuse est fixée à 4°C.

25 mL de cellules sont ensuite collectés dans un tube froid de 50 mL. Après 5 minutes de stockage du tube dans de la glace, les cellules sont centrifugées (1000 g, 4°C, 5 minutes).

Le surnageant est ensuite éliminé et le liquide résiduel est enlevé en retournant le tube sur du papier adsorbant pendant 1 minute. Le culot de bactéries est resuspendu précautionneusement sous agitation (vortex) dans 10 mL de tampon de transformation.

Après 5 minutes, les cellules sont centrifugées (3000 g, 5 minutes, 4°C). Le surnageant est ensuite aspiré puis le tube est retourné sur du papier adsorbant pendant 1 minute. Le culot de bactéries est ensuite resuspendu dans 2 mL de tampon de transformation en agitant au vortex doucement. Des aliquots de 20 µL sont enfin réalisés, ils sont ensuite congelés (azote liquide) et stockés (- 80°C).

1.2. Amplification plasmidique

1.2.1. Transformation bactérienne

La première étape de l'amplification plasmidique est la transformation bactérienne. Pour la réaliser, deux types de cellules bactériennes KL740 et JM109 sont utilisées. Les cellules KL740 servent exclusivement à l'amplification du plasmide codant pour σ_{28} , les cellules JM109 quant à elles sont utilisées pour tous les autres plasmides à amplifier.

Les cellules compétentes stockées à -80°C sont placées dans de la glace pendant 5 minutes. 1,5 µL de plasmides d'ADN d'intérêt sont ensuite ajoutés avec précaution dans un tube contenant 20 µL de cellules (le tube est « tapoté » 2 à 3 fois). Un choc thermique permettant d'accroître la perméabilité de la membrane bactérienne est ensuite réalisé. Pour cela, le tube est stocké pendant 10 minutes dans de la glace avant d'être placé pendant 20 secondes dans un bain-marie stabilisé à température adaptée (28°C pour les cellules KL740 et entre 42 et 43° pour les cellules JM109). Les tubes sont à nouveau stockés dans de la glace pendant 5 minutes. 500 µL de milieu Luria Broth (10 g/L Tryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L extraits de levure) sont ensuite ajoutés dans le tube suivi d'une étape d'incubation de 40 min à 20°C pour KL740 et à 37°C pour JM109 afin de restaurer le métabolisme et la croissance des bactéries. Le tube est ensuite centrifugé pendant 1min30 à 7300 g. Le surnageant est supprimé. Le volume final du culot est de 20-30 µL. Sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM), quelques microlitres de solution sont déposés au milieu d'une boîte de Pétri LB-Agar contenant de l'ampicilline, antibiotique permettant de séparer les bactéries comportant des plasmides portant le gène de résistance à cet antibiotique de celles sans plasmides qui ne pourront pas croître. L'ampicilline est ajoutée à la concentration finale de 100 µg/mL. Les quelques µL de solutions sont étalés à l'aide d'un râteau. La boîte est ensuite placée dans un incubateur à 28°C pour KL740 ou à 37°C pour JM109 pendant au minimum 1 nuit afin de permettre aux bactéries de croître.

2.2.2. Mini culture bactérienne

La seconde étape consiste en une préparation d'une mini-culture bactérienne permettant l'amplification des plasmides d'ADN.

Un clone (colonie) est sélectionné sur la boîte de culture à l'aide d'un cône. Ce clone est placé dans un tube de 15 mL contenant 5 mL de milieu LB additionné de 2,5 µL d'ampicilline à la concentration finale de 50 µg/mL. La mini-culture ainsi préparée est placée dans un incubateur-agitateur à 37°C pour JM109 pendant 8 heures ou à 28°C pour KL740 pendant 10 heures. Une fois le temps écoulé, la solution ne doit plus être transparente. La solution contenue dans ce tube est ensuite transférée dans un tube eppendorf. Ce tube est ensuite centrifugé pendant 1min30 à 7300 g. Après la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé afin de ne récupérer que le dépôt bactérien. Les préparations sont ensuite stockées à 4°C.

1.3. Extraction plasmidique

L'étape suivante consiste en l'extraction et la purification des plasmides d'ADN. Pour cela un kit de préparation contenant des solutions de resuspension, lyse, neutralisation, lavage optionnel, lavage (*GenElute, Plasmid Mini prep kit, PLN350-1KT, Sigma*) est utilisé.

Les tubes stockés à 4°C sont placés à température ambiante. 200 µL de la solution de resuspension sont ajoutés dans chaque tube et le culot est resuspendu par aspirations/refoulements à l'aide d'une pipette. 200 µL de solution de lyse, permettant la libération de l'ADN plasmidique contenu dans les bactéries, sont ajoutés dans les tubes avant de les refermer. Les tubes sont ensuite retournés 5 à 6 fois. Au bout de 4 minutes, les tubes sont ouverts rapidement et 350 µL de tampon de neutralisation sont ajoutés dans chaque tube qui sont à nouveau fermés et retournés 5 à 6 fois. Après avoir laissé les tubes reposer quelques secondes, les tubes sont à nouveau retournés avant d'être centrifugés pendant 10 minutes à 16000 g.

Pendant ce temps, les colonnes d'extraction sont placées dans des tubes eppendorf et 500 µL de solution de préparation par colonne sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés 1 minute à 16000 g puis le liquide qui est passé à travers la colonne est éliminé. Après 10 minutes de centrifugation (16000 g) des cellules, le surnageant est prélevé et placé sur les colonnes d'extraction. Les tubes sont ensuite centrifugés 1 minute à 16000 g. Le liquide passé à travers les colonnes d'extraction est éliminé. Cette étape permet à l'ADN plasmidique de se fixer dans la colonne d'extraction pour laquelle il présente une forte affinité. L'ADN plasmidique adsorbé est ensuite purifié, à l'aide de deux tampons de lavage. Le premier tampon dit « tampon de lavage optionnel » permet d'éviter la contamination par des

nucléases tandis que le second contenant de l'éthanol 99% va permettre d'éliminer les molécules adsorbées dans la colonne d'extraction à l'exception de l'ADN plasmidique qui est insoluble dans l'éthanol. Pour cela, 500 µL de la solution de lavage optionnel sont ajoutés. Le tube est centrifugé 1 minute à 16000 g puis le liquide passé à travers les colonnes est éliminé. Cette étape de lavage est répétée à deux reprises avec la solution de lavage. Toutefois, lors du dernier lavage, une attente de deux minutes est nécessaire avant d'effectuer la centrifugation. Les tubes sont ensuite centrifugés 3 minutes à vitesse maximale afin de sécher les colonnes d'extraction et d'éliminer l'excès d'éthanol présent dans le tampon de lavage. Afin d'éluer l'ADN plasmidique purifié contenu dans les colonnes d'extraction, ces dernières sont placées dans de nouveaux tubes eppendorf avant d'y ajouter 100 µL d'eau. Après 10 minutes, les tubes sont centrifugés pendant 2 minutes à vitesse maximale. Dans cette étape finale, le liquide passé à travers les colonnes d'extraction est récupéré.

Remarques :

(1) Dans le cas d'une importante amplification de plasmides, une seconde centrifugation de 10 minutes suivie de la récupération du surnageant peut être effectuée.

(2) Dans le cas où la solution d'ADN plasmidique obtenue n'est pas assez concentrée, un évaporateur rotatif (sans séchage total) peut être utilisé pour concentrer la solution.

1.4. Vérification de la taille des ADN plasmidiques

Pour vérifier la taille des ADN plasmidiques un mini gel est préparé à partir d'une solution d'agarose à 1% (v/v) diluée dans du tampon TAE (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA) 1X, pH 8,3. Le gel est coulé dans le support de gel adapté dans lequel un peigne a été ajouté. Afin de réticuler, le gel est laissé à température ambiante durant 3 à 4h ou stocké à 4°C. Le peigne est ensuite retiré et le gel est installé dans la cuve de migration avant d'être recouvert de tampon TAE 1X.

Les échantillons d'ADN plasmidique de 10µL sont préparés à la concentration de 150 ng/µL en y ajoutant 1,5 µL de marqueur de taille d'ADN (1 kb, Référence : N3232S, New England Biolabs Inc). Les échantillons sont déposés dans les puits.

La migration des échantillons et du marqueur de taille est ensuite réalisée. Une fois la migration terminée, le gel est démoulé puis placé dans un bain de BET avant d'être rincé dans de l'eau milliQ. Le gel peut ensuite être observé et pris en photographie.

1.5. Détermination de la masse molaire des solutions plasmidiques

Les plasmides d'ADN ainsi obtenus sont ajoutés dans les systèmes d'expression protéique acellulaire à une concentration finale de 5 nM. Il est donc nécessaire de déterminer la concentration molaire des plasmides que nous avons extraits lors de la précédente étape.

Il existe deux méthodes que nous avons utilisées. La première utilise une solution de Picogreen et la seconde utilise un spectrophotomètre UV appelé « nanodrop » (*ThermoScientific*). Les deux méthodes donnent des résultats similaires.

Protocole “Picogreen” (*Quant-iT Picogreen dsDNA-Assay Kit, P11496, Invitrogen*):

Afin de déterminer la concentration molaire des solutions plasmidiques, un kit Picogreen et un tampon TE (Tris EDTA) 1X sont requis.

Une courbe de calibration est réalisée à partir du tube d'ADN de concentration 1250 ng/mL compris dans le kit. 4 tubes de calibration de 0, 1, 10 et 100 ng/mL de concentration d'ADN sont préparés.

Pour chaque échantillon de plasmide d'ADN dont nous souhaitons déterminer la concentration, 3 tubes sont préparés. Un premier tube dans lequel le plasmide d'ADN est dilué 40 fois. A partir de ce tube, deux tubes sont préparés, l'un dont la dilution finale du plasmide d'ADN est de 2500 et l'autre de 1250. Le réactif Picogreen est ajouté dans chaque tube avant d'être mélangé pour obtenir une bonne homogénéité. Après 15 minutes à température ambiante, 200 μ L de chaque tube sont placés dans une plaque de 384 puits puis lus à l'aide d'un lecteur de fluorescence pour microplaques. La concentration déterminée en ng/ μ L par le spectrofluorimètre est convertie en nM en utilisant la valeur de la masse molaire des plasmides utilisés liée à leur taille en nombre de paires de bases.

Protocole de mesure de la concentration d'ADN plasmidique à l'aide du « nanodrop » :

Le « nanodrop » est un appareil permettant de mesurer la quantité d'ADN en ng/ μ L présente dans un échantillon. L'avantage de ce spectrophotomètre est qu'il nécessite le dépôt d'une quantité faible (entre 0,5 et 2 μ L) de l'échantillon analysé.

La cellule de mesure du « nanodrop » est d'abord rincée avec de l'eau milliQ et essuyée délicatement. 2 μ L de solution de plasmide d'ADN sont ajoutés dans la cellule de mesure. Cette dernière est ensuite fermée et la mesure est alors effectuée. Après mesure, la cellule de mesure est rincée et la concentration déterminée en μ g par le spectrophotomètre est convertie en nM en utilisant la valeur de la masse molaire des plasmides utilisés.

2. Expression de protéines *in vitro*

Le système d'expression protéique acellulaire utilisé pour la production de protéines *in vitro* nécessite la préparation indépendantes de trois principales solutions : un extrait cellulaire bactérien, une solution appelée PGA en raison de son principal composant l'acide 3-phosphoglycérique (PGA) et une solution d'acides aminés. Les protocoles d'obtention des différentes solutions sont décrits ci-après.

2.1. Extrait cellulaire utilisé

L'extrait cellulaire nous a été fourni par l'équipe de Vincent Noireaux (Université du Minnesota, Minneapolis) dans le cadre d'une collaboration. L'extrait brut est préparé avec des cellules *Escherichia coli* BL21 Rosetta 2 selon le protocole décrit par Shin et Noireaux². Nous le décrivons succinctement. Dans un premier temps les cellules croissent à 37°C dans un milieu 2xYT-Broth (16 g tryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl) jusqu'à une densité optique mesurée à 600 nm de 1,5 (u.a). Les cellules sont lavées à deux reprises et resuspendues dans un tampon S30 A (50 mM Tris, 60 mM glutamate de potassium, 14 mM de glutamate de magnésium, pH 7,7 et 2 mM de DTT). Les cellules sont ensuite cassées avec un agitateur-secoueur (bead-beater) en utilisant des billes de verre. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 30000 g pendant 25 minutes. Le surnageant est pré-incubé pendant 80 minutes à 37°C puis centrifugé à 30000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite dialysé pendant 3 heures à l'aide d'un tampon S30 B (5 mM Tris, 60 mM glutamate de potassium, 14 mM glutamate de magnésium, pH 8.2, 1 mM DTT). L'extrait brut est ensuite aliquoté et stocké à -80°C. Il est stable pendant au moins 1 an dans ces conditions².

2.2. Préparation PGA

Les différents composants nécessaires pour préparer une solution de PGA sont les suivants : Hepes (*Sigma H6147*), ATP (*Sigma, A8937-1G*), GTP (*USB, 16800*), UTP (*USB, 23160*), CTP (*USB, 14121*), Hydroxyde de potassium 45% (*Sigma 417661*), *E. Coli* ARNt (*Roche 109541*), Coenzyme A (*Sigma C4282*), Beta-nicotinamide adénine dinucléotide (*Sigma N6522*), Adénosine 3',5' cycli monophosphate monohydrate (*Sigma A9501*), Acide folinique (*Sigma F7878*), Spermidine (*Sigma 85558*), Acide 3-phosphoglycérique (*Sigma P8877*).

La solution de KOH à 15% (v/v) et le tampon Hepes 2 M, pH 8 ajusté avec la solution de KOH 15% sont préparés au préalable. Les composants sont ensuite préparés

indépendamment avant de réaliser le mélange selon les proportions répertoriées dans le Tableau 4.

Composants du PGA	Concentration finale
Hepes pH 8	50 mM
Nucléotides	
ATP>P	1,5 mM
CTP&UTP	0,9 mM
ARNt	0,2 mg/ml
CoA	0,26 mM
AMPc	0,33 mM
Acide folique	0,75 mM
Spermidine	1 mM
3-PGA	30 mM

Tableau 4 : Répartition des différents composants de la solution de PGA.

La solution est ensuite aliquotée puis congelée dans de l'azote liquide avant d'être stockée à -80°C.

2.3. Préparation AA

Les acides aminés sont préparés à l'aide du kit RTS Amino Acid Sampler (*5PRIME*). Pour la préparation, la moitié d'un kit est nécessaire. Les acides aminés Cystéine, Phénylalanine et Asparagine sont placés à température ambiante. Les 20 tubes d'acides aminés sont mélangés à l'aide d'un vortex toutes les 10 minutes jusqu'à décongélation complète puis ils sont chauffés à 37 °C. 6 mL d'eau sont ajoutés dans un tube de 15 mL. Dans l'ordre sont ensuite ajoutés 750 µL de chaque acide aminé de concentration 168 mM à l'exception de la Leucine dont la concentration est de 140 mM (Alanine, Arginine, Asparagine, Acide Aspartique, Glutamine, Acide Glutamique, Glycine, Histidine, Isoleucine, Lysine, Méthionine, Phénylalanine, Proline, Sérine, Thréonine, Valine, Leucine, Tryptophane, Tyrosine, Cystéine). La solution est chauffée entre les mains jusqu'à devenir transparente. Des aliquots sont ensuite préparés à partir de cette solution puis congelés dans de l'azote liquide et enfin stockés à -80°C.

2.4. Préparation du système d'expression protéique acellulaire

Les différents composants préparés comme nous l'avons précédemment décrit sont mélangés en laissant les tubes dans de la glace selon les proportions répertoriées dans le Tableau 5.

Composants	Concentration finale
Extraits bruts	33% du volume final
Glutamate de magnésium	2 mM
Glutamate de potassium	60 mM
Acides aminés	1 mM
PGA	7,15%
PEG8000 à 40%	2 %
Plasmide $\sigma 28$	0,5 nM
Plasmide d'ADN	5 nM
Eau	

Tableau 5 : Répartition des différents composants utilisés dans le système d'expression protéique acellulaire.

2.5. Vérification de la production de protéines

La production de protéines peut être contrôlée par utilisation d'un gel de protéines. Le kit utilisé est le kit NuPage Bis Tris 4-12% d'Invitrogen.

Au préalable les échantillons sont préparés comme suit : 3 μ L de solution protéique produite par le système d'expression protéique acellulaire auxquels sont ajoutés 2,5 μ L de LDS (tampon de charge), 1 μ L d'agent réducteur (NuPAGE® Reducing Agent) 10X de formule chimique 2,3-Butanediol, 1,4-dimercapto- (theta, theta)-(+/-)- ainsi que 3,5 μ L d'eau stérile. Les échantillons sont ensuite dénaturés par chauffage durant 5 min à 95°C.

Le gel de protéines est placé dans la cuve de migration et du tampon de migration MOPS SDS Running Buffer 20X (50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7), dilué à 1X est ajouté. 10 μ L de chaque échantillon sont ajoutés dans les puits. 8 à 9 μ L du marqueur de taille SeeBlue® Plus 2 d'Invitrogen sont ajoutés dans 2 autres puits. La migration des échantillons est ensuite réalisée. A la fin de la migration, le gel est démoulé puis rincé à trois reprises avec de l'eau milliQ, sur une table d'agitation. Le gel est ensuite recouvert avec la solution Simply Blue SafeStrain et agité pendant 1 h avant d'être rincé dans de l'eau milliQ sous agitation durant une nuit. Le gel est ensuite observé et une photographie est prise.

3. Préparation des solutions de liposomes

3.1. Lipides

Les lipides utilisés dans le cadre de ces travaux sont des lipides commerciaux que nous nous sommes procurés auprès de la société « Avanti Polar Lipids ». La liste des lipides que nous avons employé est décrite ci-après :

- POPC

Ce lipide est le 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (*Référence : 850457*) :

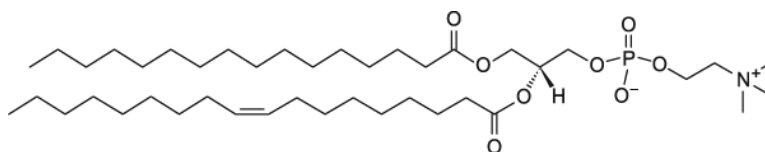


Figure 55 : Formule du POPC.

- NBD-PC

Ce lipide est le 1-oleoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine (*Référence : 810132*) :

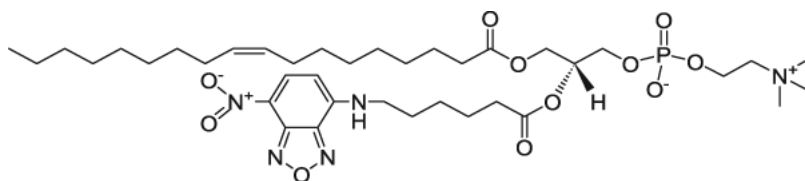


Figure 56 : Formule du NBD-PC.

Cette molécule fluorescente a une longueur d'onde d'excitation de 460 nm et une longueur d'onde d'émission de 534 nm.

- *E.coli* total extract

Ce mélange de lipides (*Référence : 100500*) est composé de 57,5 % de phosphatidyléthanolamine (PE), 15,1% de phosphatidylglycérol (PG), 9,8% de cardiolipides et 17,6% de composants inconnus.

3.2. Tampons utilisés pour la préparation des suspensions de liposomes

Pour la préparation des suspensions de liposomes, deux tampons ont été utilisés :

- le tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) de composition : 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl ,pH 7,4
- le tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2mM, pH 7,4

3.3. Préparation des solutions lipidiques

Les lipides sont préalablement dissous dans du chloroforme et stockés à -20°C .

A l'aide de seringues en verre (Hamilton), les volumes désirés sont prélevés et déposés dans des tubes en verre. Le chloroforme est ensuite évaporé par chauffage (*les tubes sont introduits dans un bain à sec dont la température est de 55°C*) combiné à un flux d'azote introduit dans le tube. Des traces de séchages sont alors visibles. Afin d'être certain que tout le chloroforme contenu dans le tube est évaporé, le tube est placé au minimum pendant 2h dans un dessiccateur. Les tubes sont ensuite fermés et stockés à 4°C .

3.4. Préparation des liposomes

Un volume défini de tampon (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM et CaCl_2 2 mM (utilisé lors de l'utilisation de lipides *E.coli*)) ou PBS préalablement filtré est ajouté dans le tube contenant les lipides. La solution tampon et les lipides sont mélangés à l'aide d'un vortex, la solution devenant alors trouble.

A l'issu de cette étape, deux méthodes pour former des liposomes de petites tailles (SUVs) ont été utilisées dans le cadre de nos travaux. Il s'agit de la sonication et de l'extrusion.

3.4.1. Première méthode : la sonification

Dans le cas de la méthode de sonication, nous avons utilisé un sonicateur de 500W (Sonics Materials) (Figure 60).



Figure 60: Photographie du sonicateur de 500W utilisé.

Le tube est placé dans un récipient contenant de la glace et de l'eau, puis la sonde à ultrasons est positionnée dans le tube. Les paramètres du sonificateur sont ajustés (puissance de 40%, 20 minutes). Une fois cette étape terminée la suspension lipidique contenue dans le tube est transférée dans des tubes eppendorfs qui sont centrifugés à deux reprises à 16000 g afin de supprimer les nanoparticules de titane provenant de la sonde à ultrasons en titane.

En fin d'expérimentation, la suspension de liposomes contenue dans le tube de verre doit être limpide (Figure 61).



Figure 61: Tubes de verre contenant des solutions lipidiques avant (à droite) et après (à gauche) sonication.

3.4.2. Deuxième méthode : l'extrusion

Dans le cas de l'extrusion de solutions lipidiques, nous utilisons un kit d'extrusion (Avanti Polar Lipids, Inc.). Le kit d'extrusion est présenté dans la Figure 62.



Figure 62 : Kit d'extrusion (Avanti Polar Lipids Inc.).

Le protocole d'extrusion suivi est le suivant : 2 seringues Hamilton et 2 supports de membrane sont nettoyés à l'éthanol et à l'eau déionisée. Les 4 supports de filtre sont imbibés du tampon utilisé pour reprendre la solution de lipides. 2 supports de filtre sont positionnés sur un support de membrane et les 2 autres sur le deuxième support de membrane. La membrane de polycarbonate de taille désirée est ensuite positionnée sur un des supports de membrane puis l'autre support de membrane est ajouté. L'ensemble est installé dans l'enveloppe externe métallique puis dans le support d'extrusion. Une seringue Hamilton est placée à une des extrémités. L'autre seringue est remplie de solution lipidique puis positionnée à l'autre extrémité. La solution est transférée à plusieurs reprises d'une seringue à l'autre jusqu'à obtention de la taille désirée. En fin d'expérience, comme pour la sonication, la solution doit être limpide (Figure 63).

Nota Bene : dans le cadre de ces travaux, la solution est passée 31 fois à travers chacune des membranes de 100 nm, puis de 50 nm et enfin de 30 nm.



Figure 63: Tubes de verre contenant des solutions lipidiques avant (à droite) et après (à gauche) extrusion.

3.5. Caractérisation de la taille des liposomes

3.5.1. La technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique également appelée spectroscopie à corrélation de photons (PCS) permettant de caractériser la taille de molécules, de particules ou de colloïdes présentes en suspension dans un liquide.

3.5.1.1. Principe :

Cette technique mesure le mouvement brownien (mouvement désordonné qu'effectuent des molécules ou particules en suspension) et le relie à la taille des molécules ou particules par le biais de l'équation de Stokes-Einstein.

Cette équation est la suivante :

$$D_h = \frac{k_b \cdot T}{3\pi\eta D_t}$$

Avec :

- k_b , la constante de Boltzmann ($k_b = 1,3806488 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$)
- T la température
- η la viscosité
- D_t le coefficient de diffusion
- D_h : le diamètre des particules ou molécules

3.5.1.2. Le système DLS

Le système DLS fonctionne à l'aide d'une source de lumière pour éclairer l'échantillon (Figure 64.2). Pour cela, un faisceau laser HeNe à une longueur d'onde de 633 nm (Figure 64.1) est utilisé. Une partie du faisceau laser traverse directement l'échantillon et une autre partie est diffusée par les particules de l'échantillon. Un détecteur positionné à 90° (Figure 64.3A) ou 173° (Figure 64.3B) permet de mesurer l'intensité de la lumière diffusée. Un atténuateur (Figure 64.4) permet de réduire ou d'augmenter l'intensité du laser et donc l'intensité de la diffusion. Par exemple, pour des échantillons ne dispersant pas beaucoup la lumière, la quantité de lumière émise par le laser à travers l'échantillon doit être augmentée. Le signal d'intensité de diffusion est transmis à un traitement de signal numérique appelé le corrélateur (Figure 64.5) qui transmet ensuite l'information de corrélation à un ordinateur (Figure 64.6).

Les détecteurs sont classiquement positionnés à 90° . Néanmoins, le développement de la détection de rétrodiffusion (Non Invasive Back Scatter) pour la mesure de la diffusion de la lumière nécessite l'utilisation d'un positionnement à 173° . Cette variante, que nous avons utilisée au cours de ces travaux via le Zetasizer (Malvern), présente de nombreux avantages. Le faisceau incident n'ayant pas besoin de traverser l'ensemble de l'échantillon, de plus fortes concentrations d'échantillon peuvent être mesurées. De plus, l'effet de diffusion multiple (lumière diffusée d'une particule à son tour dispersée par d'autres particules) peut être évité et l'effet lié aux particules volumineuses de poussières présentes dans l'échantillon peut être réduit.

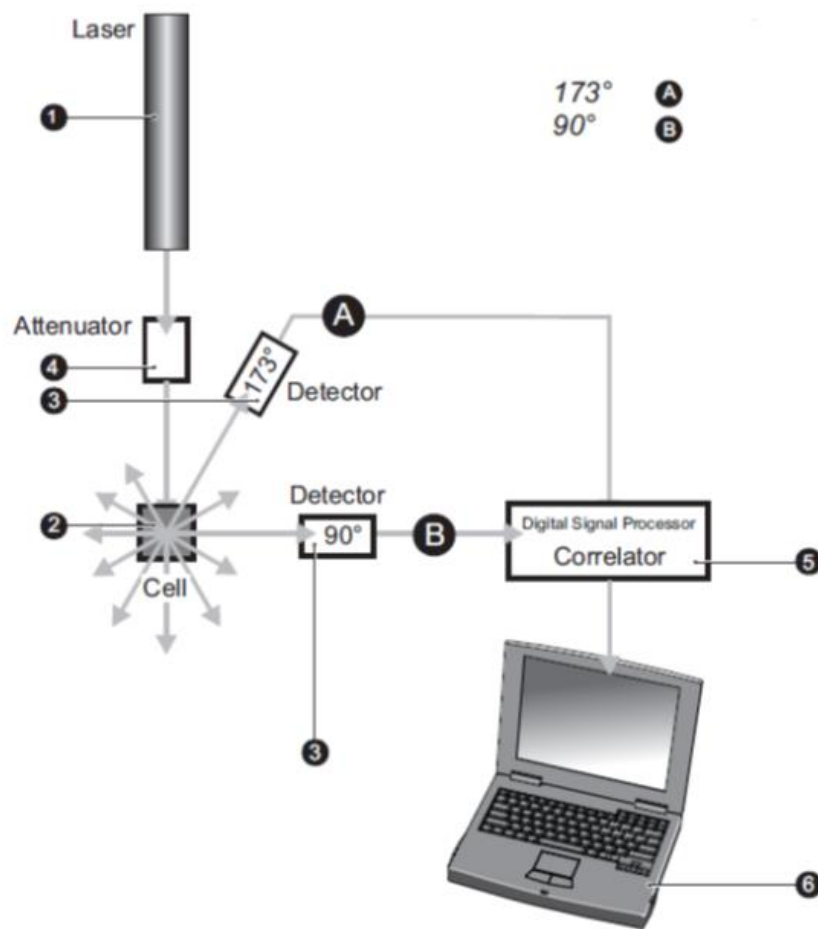


Figure 64 : Schéma représentatif du système DLS.

3.5.2. Protocole expérimental

100 µL de la suspension de liposomes extrudés ou soniqués sont prélevés et placés dans une micro cuve d'analyse neuve. Une mesure DLS de taille est amorcée pour contrôler la taille des liposomes et la pureté de la solution. A la fin de la mesure, la solution est récupérée. Un flux d'azote est ajouté dans le tube contenant la solution de liposomes avant de refermer le tube et de le stocker à 4°C pour quelques jours.

4. Formation d'une bicouche lipidique et incorporation de protéines produites par le système d'expression protéique acellulaire (CFPS)

4.1. Tampons utilisés

Pour la formation d'une bicouche lipidique supportée (SLB) ou espacée et ancrée (tBLM) trois différents tampons ont été utilisés :

- le tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) de composition : 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl ,pH 7,4
- le tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2mM, pH 7,4 (HEPES NaCl CaCl_2)
- le tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (HEPES NaCl)

En revanche pour l'incorporation de protéines produites par le système d'expression, acellulaire seul le tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) a été utilisé.

4.2. Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par QCM-D

4.2.1. Technique de microbalance à quartz et à dissipation (QCM-D)

La microbalance à cristal de quartz (QCM) est une technique servant à mesurer la masse d'un film mince déposée sur une surface (Figure 65). Son principe repose sur la variation de fréquence de résonance d'une lame de quartz, cette variation étant due à une augmentation de la masse déposée sur la surface.

A l'origine, cette technique a été développée pour des mesures dans l'air ou dans le vide, permettant ainsi de mesurer la masse d'un dépôt rigide comme un film métallique. Cette technique a considérablement évoluée dans les années 90 suite au développement de la microbalance à quartz et à dissipation (QCM-D) par Rodahl et coll^{3,4} permettant des mesures en milieu liquide et de ce fait ouvrant l'accès à un champ considérable d'applications nouvelles. La première commercialisation par QSense en 1996, a permis petit à petit une

démocratisation de cette technique dans le domaine de la biologie avec la possibilité d'étudier en temps réel l'adsorption de molécules (protéines, polymères, lipides, ...), de mesurer quantitativement des interactions entre biomolécules, de caractériser la formation de bicouches supportées (cas qui nous intéresse dans le cadre de ces travaux), de mieux comprendre les mécanismes d'adhésion cellulaire^{4,5}.

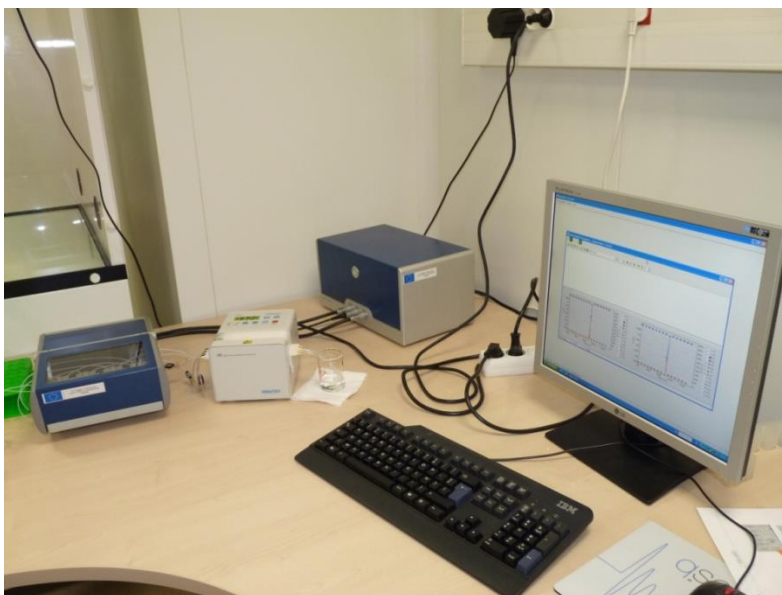


Figure 65 : Photographie de la microbalance à quartz et à dissipation à 4 chambres (QSense).

La QCM-D permet non seulement de quantifier les masses déposées mais également de caractériser les propriétés viscoélastiques des couches adsorbées en surface. Ce paramètre permet de suivre des transitions de phase, de distinguer les différents états du matériel déposé sur la surface³.

Cette technique présente l'avantage, contrairement à d'autres techniques, de ne pas requérir l'utilisation de marquage spécifique⁶. Elle a une limite de détection de 1,8 ng/cm².

4.2.1.1. Principe du fonctionnement de la QCM-D

Un cristal de quartz de 14 mm de diamètre et 0,3 mm d'épaisseur est utilisé pour les mesures par QCM-D. Il est positionné entre deux électrodes en or. C'est un oscillateur harmonique amorti qui vibre transversalement à sa surface.

Du fait de ses propriétés piézo-électriques, l'application d'un courant électrique alternatif à travers le cristal de quartz va induire des oscillations mécaniques. Les oscillations mécaniques peuvent être enregistrées en mesurant l'amortissement de l'oscillation. La variation de ces oscillations mécaniques dans le temps permet d'en extraire la fréquence de résonance (f) et la dissipation (D). Lorsqu'une masse est ajoutée, il est observé une

diminution de la fréquence de résonance. Plus le film est viscoélastique, plus il dissipe, d'où une comparaison possible des propriétés d'un film mince.

4.2.1.2. Détermination de la masse adsorbée

A l'origine de cette technique, ce système a été modélisé par une équation établie par Sauerbrey en 1959. Cette relation linéaire relie la fréquence de résonance Δf et la masse ajoutée à la surface du quartz $\Delta m^{3,4}$. Cette relation est la suivante : $\Delta m = C/n \cdot \Delta f$

Pour une fréquence fondamentale f_0 de 5 MHz, elle prend en considération la masse adsorbée (Δm), la sensibilité constante du détecteur (C) de $17,7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$ indépendante du matériel adsorbé, l'harmonique de fréquence (n) et le déplacement de fréquence (Δf).

Tous les harmoniques (3,5,7,...) peuvent être utilisés pour les mesures à l'exception du premier, écarté de par son manque de sensibilité³.

Cette relation de Sauerbrey est principalement utilisée pour des applications dans l'air ou dans le vide. En effet cette relation n'est valide que si plusieurs conditions sont respectées. Il est nécessaire que les masses adsorbées soient petites (par rapport à la masse du cristal), uniformément réparties et rigides.

Dans le cadre d'applications biologiques, la contrainte de rigidité requise pour une utilisation correcte de cette équation, n'est le plus souvent pas obtenue. Si cette équation est utilisée alors qu'il existe un comportement viscoélastique des couches adsorbées, la masse réelle sera sous-estimée. Il a été montré que cette équation n'est plus valide quand $\Delta D/\Delta F > 0.2.10^{-6} \text{ Hz}^{-1}$.

D'autres modèles plus complexes (modèle de Voight-Voinova⁷ ou modèle de Maxwell⁷), prenant en compte les propriétés viscoélastiques des couches de surfaces, devront être utilisés. Dans notre étude nous avons utilisé le modèle de Voight-Voinova⁷ qui permet de modéliser le matériel viscoélastique ajouté sur la surface du quartz en un circuit mécanique en parallèle constitué d'un ressort et d'un amortisseur (Figure 66).

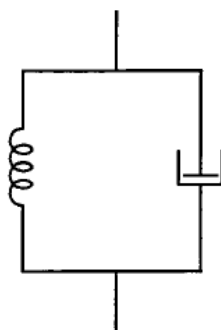


Figure 66 : Représentation schématique d'un élément viscoélastique dans le modèle de Voight⁷.

4.2.2. Protocoles expérimentaux : formation d'une bicouche lipidique supportée (SLB) ou espacée (tBLM)

4.2.2.1. Préparation des surfaces

- Surfaces de SiO₂

Les surfaces commerciales de quartz recouvertes de SiO₂ (QSX 303) sont nettoyées avec de l'éthanol puis rincées avec de l'éthanol 99% puis de l'eau milliQ. Elles sont enfin séchées sous un flux d'azote avant d'être rendues hydrophiles par utilisation d'un plasma à oxygène Tepla (800 W, 5 minutes, 1,5mBar) ou Diener (95%, 5 minutes, 1,5 mBar).

- Surfaces d'or

Les surfaces commerciales de quartz recouvertes d'or (QSX 301) sont nettoyées dans un mélange H₂O :NH₃ :H₂O₂ (5 :1 :1, v : v : v) pendant 5 minutes puis rincées avec de l'eau milliQ. Elles sont ensuite séchées sous un flux d'azote.

Dans le cas où des bicouches lipidiques supportées (SLB) sont formées sur des surfaces d'or, la surface est rendue hydrophile à l'aide d'un plasma à oxygène (Tepla 200 W, 5 minutes, 1,5 mBar avec cage de Faraday).

4.2.2.2. Protocole expérimental sur surface de SiO₂

Après préparation de la surface des quartzs recouverts de SiO₂, les quartzs sont placés dans les chambres de QCM-D. Le tampon filtré et dégazé, afin d'éviter la formation de bulles dans le système fluide de la QCM-D, est injecté dans les chambres par le système fluide à la vitesse de 250 µL/min jusqu'à ce que les signaux soient stabilisés. La vitesse de passage du tampon est abaissée à 100 µL/min. 1 mL de suspension lipidique à la concentration de 0,1 mg/mL est injecté dans chaque chambre à la vitesse de 100 µL/min. Du tampon est ensuite ajouté (100 µL/min) afin d'enlever l'excédent de la surface.

4.2.2.3. Protocole expérimental sur surface d'or

Après préparation de la surface décrite dans la partie 4.2.2.1, les quartzs recouverts d'or sont placés dans les chambres de QCM-D. Le tampon filtré et dégazé est injecté à la vitesse de 250 µL/min par le système fluide jusqu'à ce que les signaux soient stabilisés. La vitesse est abaissée à 100 µL/min. 1 mL de solution de liposomes à la concentration de 0,1 mg/mL est injecté dans chaque chambre à la vitesse de 100 µL/min. Du tampon est ajouté (100 µL/min) pour rincer la surface et éliminer le matériel non spécifique. Une solution d'alpha peptide (PEP1, référence 60430-1, Tebu-Bio) de concentration 0,05 mg/mL est

injectée à la vitesse de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (1mL par chambre). La solution d'alpha peptide, permettant l'ouverture des liposomes, est récupérée en sortie de tube et réinjectée dans les chambres de QCM-D. Du tampon est ensuite injecté à la vitesse de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ quand l'alpha peptide ne semble plus avoir d'effet durant 15 à 20 minutes.

4.2.3. Protocole expérimental : incorporation de protéines produites par expression protéique acellulaire (CFPS) sur une bicouche lipidique supportée (SLB) ou une bicouche lipidique ancrée et espacée (tBLM)

Après préparation d'une SLB ou tBLM, la température est augmentée à 30°C. Une fois les signaux stabilisés, une nouvelle fenêtre de mesure est lancée. 180 μL de solution de CFPS sont injectés dans chaque chambre de QCM-D à une vitesse de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. Une fois que la solution est dans la chambre, le flux est abaissé à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ durant 5 minutes afin que toute la chambre soit remplie de la solution de CFPS. Le flux est ensuite stoppé pour 3 heures. Une fois la période d'incubation terminée, du tampon filtré et dégazé est injecté à la vitesse de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 20 minutes puis à 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 20 minutes et enfin 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 20 minutes.

4.3. Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par SPR

4.3.1. La technique de Résonance plasmonique de surface (SPR)

La technique de résonance plasmonique de surface (SPR) s'est imposée dans les laboratoires comme une technique de référence dans les années 90 pour l'étude des interactions moléculaires en surface⁵.

Cette méthode permet de caractériser la formation de monocouches auto-assemblées sur des surfaces, des interactions protéines-protéines, l'hybridation d'ADN en temps réel des interactions entre molécules et d'obtenir des cinétiques de réaction (constantes d'association et de dissociation)⁸.

Cette technique présente l'avantage comme la QCM-D de ne pas requérir de marquage des molécules⁵.

- Principe de fonctionnement de la SPR

La technique SPR est une technique sensible aux changements de propriétés optiques de la solution en contact avec une surface métallique. Cette surface métallique peut être de l'or ou de l'argent. L'or étant plus stable dans les conditions d'utilisation, son usage est dans la majorité des cas privilégié^{5,8}.

Le système de détection SPR de la société Biacore comprend plusieurs éléments : une source lumineuse polarisée et monochromatique, un prisme en verre recouvert d'un fin film métallique et un photodétecteur (Figure 67).

Cette technique de résonance plasmonique de surface est basée sur l'utilisation d'ondes électromagnétiques évanescentes se propageant à proximité de la surface.

En illuminant la surface du prisme recouverte d'un film fin métallique avec un rayon lumineux incident selon un angle de résonance dépendant de l'indice de réfraction de la surface, des plasmons de surface sont créés. L'intensité de la lumière réfléchie décroît et une partie est transférée aux plasmons de surface. L'ajout d'une solution biologique (contenant des protéines, de l'ADN, ...) induit une variation de l'angle de résonance. La valeur de l'angle de résonance dépend de l'indice de réfraction, lui-même étant la résultante de l'indice optique des molécules en surface et de leur densité. Cet angle de résonance au cours du temps est enregistré. La variation de l'angle de résonance au cours du temps est exprimée en unité arbitraire appelée « unité de résonance » (RU)^{5 9}.

Afin de relier l'unité de résonance mesurée à la masse adsorbée, des corrélations existent. Dans nos travaux, pour connaître la masse adsorbée de molécules lipidiques nous avons utilisé la relation suivante : $1 \text{ RU} = 0.092 \pm 0,005 \text{ ng/cm}^2$ ¹⁰.

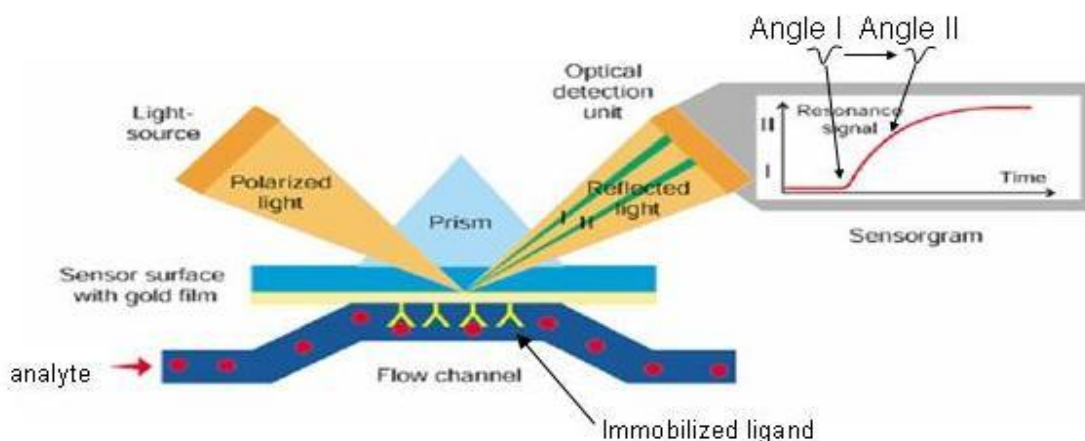


Figure 67 : Schéma du système expérimental de Résonance Plasmonique de Surface (SPR).

4.3.2. Protocole expérimental : formation d'une tBLM

Un BIAcore 3000 (GE Healthcare) a été utilisé. Il est équipé d'une puce de détection dont la surface est recouverte d'or. Les puces ont été nettoyées avec un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_3$ (5 : 1 : 1, v : v : v). Les puces de détection ont ensuite été montées sur des supports de puces selon le protocole fourni par GE Healthcare. La puce a été lavée avec du

tampon PBS à une température de 25°C. 100 µL d'une solution de liposomes de concentration 0,1 mg/mL ont été injectés dans les cellules fluidiques à la vitesse de 10 µL/min. Les surfaces ont ensuite été lavées avec 150 µL de tampon PBS à la vitesse de 10 µL/min. 100 µL d'une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL a été injectée à la vitesse de 5 µL/min. Les cellules fluidiques ont ensuite été rincées avec 200 µL de tampon PBS à la vitesse de 5 µL/min.

4.3.3. Protocole expérimental : production et incorporation de protéines dans une tBLM

Afin d'optimiser l'expression protéique par le système CFPS, après la formation de la tBLM décrite précédemment, la température est augmentée à 30°C. Après stabilisation des signaux, 80 µL de CFPS sont injectés à la vitesse de 5 µL/min. Le flux est arrêté pendant 3h et puis les cellules fluidiques sont nettoyées avec du tampon PBS (100 µL, 5 µL/min).

4.4. Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par FRAP

4.4.1. La technique de recouvrement de la fluorescence après photo-blanchiment (FRAP)

La technique de recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP) a été développée à la fin des années 70 suite à l'introduction de lasers dans le domaine de la microscopie¹¹.

Les molécules d'intérêt étudiées doivent être marquées à l'aide de divers fluorophores (fluorescéine, rhodamine, cyanine,...)⁵.

4.4.1.1. Principe de la technique de FRAP

Cette technique consiste à mesurer le retour ou non du signal de fluorescence après l'extinction localisée du signal de fluorescence produit par une espèce fluorescente.

La technique de FRAP repose sur le photo-blanchiment d'une espèce fluorescente à l'aide d'un faisceau laser focalisé sur une zone déterminée à une longueur d'onde donnée, adaptée aux molécules fluorescentes utilisées. La zone fluorescente déterminée est « photo-blanchie ». Ce phénomène est dû à l'importante intensité lumineuse appliquée sur la surface couplée à la présence d'oxygène. Ceci provoque la rupture de liaisons covalentes sous l'effet d'une oxydation, provoquant des dommages irréversibles aux molécules fluorescentes. Ces molécules fluorescentes ne pourront donc pas contribuer au recouvrement de la

fluorescence. La réapparition de la fluorescence est donc liée à la diffusion des molécules fluorescentes provenant des régions proches de la région photo-blanchie (Figure 68).

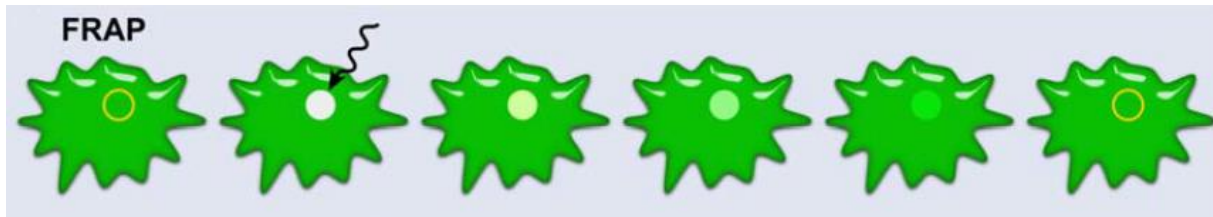


Figure 68: Représentation schématique des expériences de FRAP. Une région d'intérêt est sélectionnée puis photoblanchie avec un faisceau laser intense. Le recouvrement de fluorescence est mesuré au cours du temps¹².

Les images de FRAP obtenues sont ensuite analysées et traitées permettant d'établir la cinétique du photo-blanchiment (intensité de fluorescence au cours du temps). Les fractions mobiles et immobiles pourront être déterminées en faisant le ratio entre la mesure d'intensité de fluorescence à un instant t et la mesure d'intensité de fluorescence au temps initial (Figure 69). La fraction mobile correspond aux molécules fluorescentes participant au recouvrement de la fluorescence, la fraction immobile correspond à toutes les autres molécules fluorescentes n'y participant pas^{5,12}.

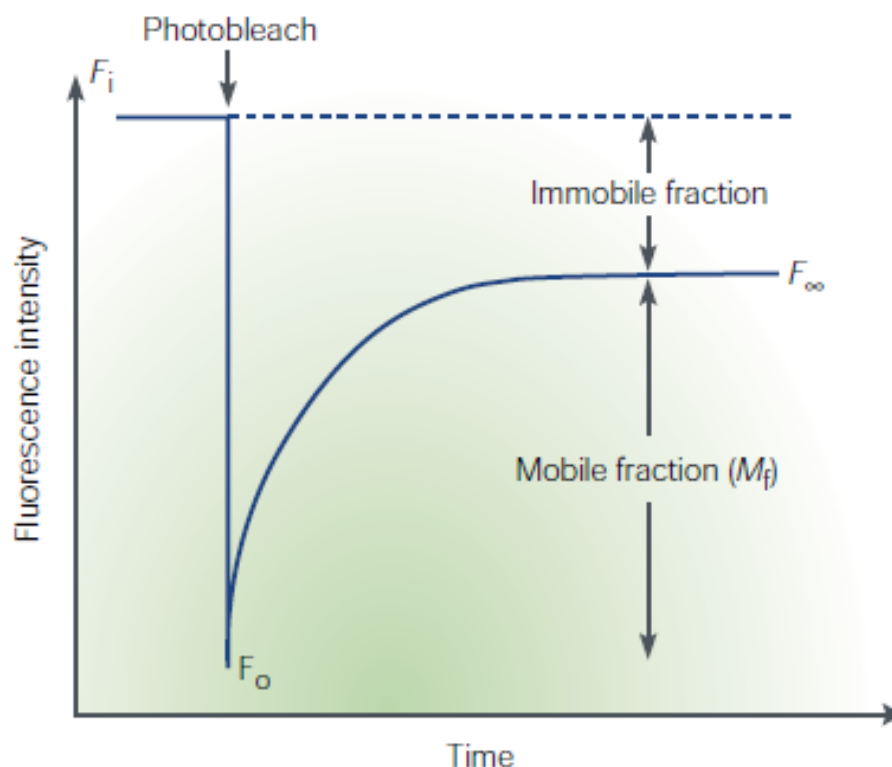


Figure 69: Graphique représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps. Après le photoblanchiment d'une zone lipidique, le recouvrement de fluorescence est suivi. Par différence entre l'intensité mesurée avant le photoblanchiment et après recouvrement de fluorescence, les fractions mobiles et immobiles peuvent être obtenues¹³.

La technique de FRAP peut de plus être utilisée pour mesurer la diffusion des molécules fluorescentes. Les coefficients de diffusion peuvent être calculés à l'aide de l'équation suivante : $D = 0,224 \cdot r^2 / t_{1/2}$ où $t_{1/2}$ correspond au temps de demi-vie de recouvrement de la fluorescence et r le rayon de la zone photoblanchie¹⁴.

4.4.1.2. Protocole expérimental

Les expériences de FRAP sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal inversé (Zeiss LSM 510 NLO) avec un objectif de grossissement 63X à immersion dans l'eau. Une région de 20 µm ou 40 µm de diamètre est photoblanchie avec un laser de puissance 15 mW à la longueur d'onde de 488 nm. Les paramètres de photoblanchiment sont : une vitesse de 5, un zoom de 2, 2 images enregistrées avant le photoblanchiment.

Une image est prise toutes les 10 secondes pendant la première minute, puis une image est toutes les minutes pendant 4 minutes.

Les images sont traitées avec le logiciel Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Pour chaque image obtenue, l'intensité de fluorescence est normalisée par rapport à l'image prise avant le photoblanchiment.

4.5. Caractérisation de la formation d'une bicouche lipidique par AFM

4.5.1. Principe de la Microscopie à Force Atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique dont la mise au point fait suite à l'invention du microscope à effet tunnel par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer en 1981¹⁵. A l'origine, utilisé dans l'air, cette technique permet d'obtenir une résolution atomique. La mise au point de cette technique en milieu liquide a permis l'étude structurale de membranes plasmiques de cellules procaryotes ou eucaryotes mais également la caractérisation de molécules uniques. Il peut aussi permettre d'évaluer les forces d'interactions intra ou inter moléculaires⁵.

- Principe et fonctionnement de l'AFM

L'imagerie par AFM est une technique dans laquelle une pointe montée sur un cantilever flexible balaye ligne par ligne un échantillon adsorbé sur une surface de préférence atomiquement plane. L'un des supports le plus utilisé est le mica (surface hydrophile) en raison de ses grandes zones planes à l'échelle atomique.

Un faisceau laser se réfléchit sur le cantilever. La déviation (ou flexion) du cantilever induit une déviation du rayon laser qui est détectée par une photodiode à quadrants puis convertie

en un signal électrique pour former les images. Un petit changement dans l'angle de flexion du cantilever est converti en une large déviation mesurable (Figure 70).

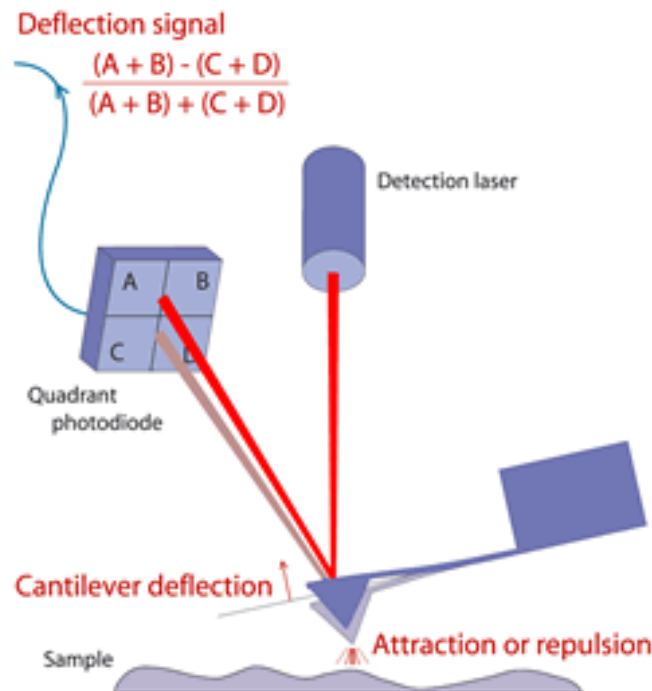


Figure 70 : Principe de fonctionnement de l'AFM d'après JPK Instrument AG.

Deux modes principaux d'imagerie sont classiquement utilisés en biologie : le mode contact et le mode contact intermittent (« tapping mode »).

Le mode contact est le mode dans lequel la pointe reste en contact avec la surface durant le balayage de l'échantillon. La force entre la pointe et l'échantillon reste constante et doit être la plus faible possible afin de limiter les dommages pouvant être causés à l'échantillon.

Le mode contact intermittent (« tapping mode ») est un mode oscillant. La pointe oscille à haute fréquence, minimisant le contact entre la pointe et l'échantillon. Ceci permet de limiter les dommages causés à l'échantillon⁸.

Il est également possible de réaliser des expériences d'indentation, permettant d'obtenir des courbes force-distance. Dans ces expériences, une force toujours croissante est appliquée en déplaçant la pointe vers la surface dans le but d'appliquer une consigne finale de force donnée. Au cours de ces cycles approche/rétraction, la déviation du cantilever traduit après étalonnage en une force est enregistrée. Ce traitement nécessite la connaissance précise de la constante de raideur du cantilever déterminée à l'aide de la méthode de bruit thermique¹⁶ et le calibrage du capteur de force, obtenue par la mesure du signal de la photodiode lorsque la pointe AFM est approchée sur une surface dure non-déformable.

Ces expériences d'indentation sont notamment utilisées lors de l'étude de bicouches lipidiques. Des événements de déformation plastique peuvent alors être observés et être directement attribués à la perforation de la bicouche (Figure 71).

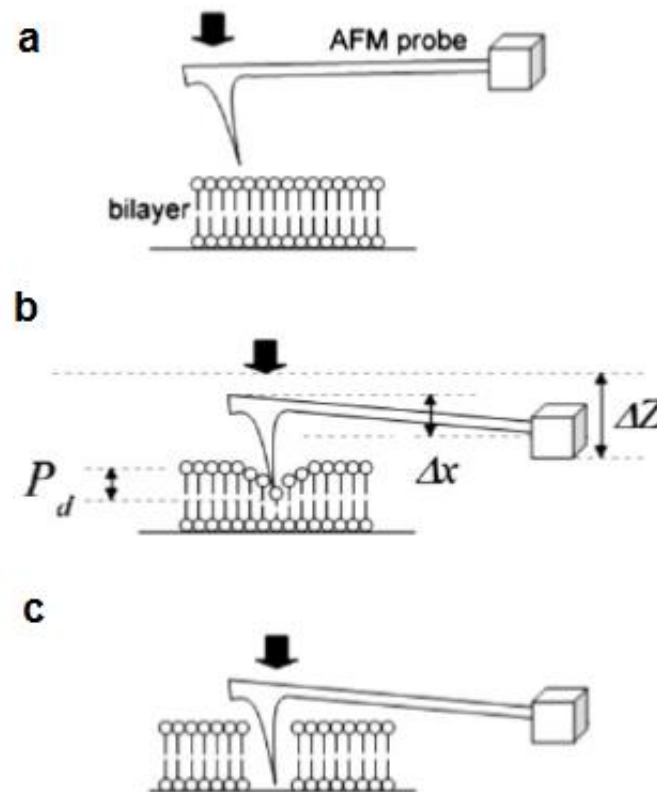


Figure 71: Schéma du procédé d'indentation sur une bicouche lipidique à l'aide de la technique AFM. a, b et c montrent les différents scénarios se produisant quand le microlevier AFM est approché de la bicouche lipidique. a) La bicouche lipidique n'est pas transpercée ; b) La bicouche lipidique est partiellement transpercée ; c) La bicouche lipidique est totalement transpercée¹⁷.

Au moment où le cantilever traverse la membrane, il en résulte un saut brutal de la pointe du cantilever, facilement visible sur la courbe force / distance (Figure 72). L'amplitude de ce saut donne des informations intéressantes sur la taille de la structure déformée plastiquement. Le saut pour une bicouche lipidique est comparable à l'épaisseur d'une bicouche (4-5 nm). Pour être quantitative un grand nombre de mesures (cycles de force / distance) est nécessaire. Des histogrammes d'amplitude des sauts peuvent ainsi être obtenus. Enfin, la méthode s'appuie également sur un ajustement adéquat de la force appliquée maximale¹⁷.

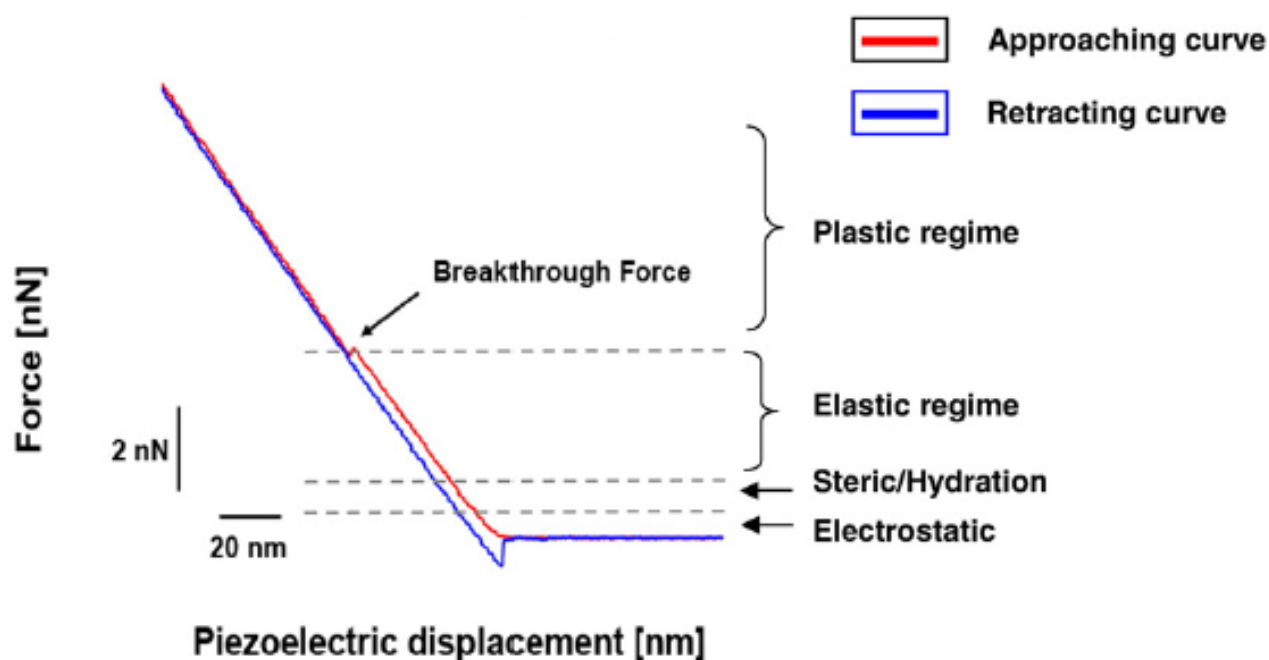


Figure 72 : Courbes de force sur une bicouche lipidique de DOPC présentant un saut de 4nm, montrant la pénétration de la pointe AFM dans la bicouche phospholipidique. Nous pouvons distinguer la courbe d'approche (rouge) et la courbe de rétraction (bleu)¹⁷.

4.5.2. Protocoles expérimentaux

4.5.2.1. Préparation des échantillons

- Préparation des échantillons sur surface de mica

Le mica (Jbg-Metafix, 24 x 32 mm) est clivé au préalable à 2 ou 3 reprises avec du scotch. 400 μ L de suspension de liposomes sont incubés pendant 30 minutes. A deux reprises la surface est rincée avec du tampon de solution (dans le cas de l'utilisation de molécules lipidiques provenant d'un extrait d'*E.coli*, deux tampons sont utilisés : HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2mM puis l'HEPES 10 mM, NaCl 150 mM. La surface peut ensuite être observée par AFM.

- Préparation des échantillons sur surface d'or

Un film d'or de 100 nm est déposé par évaporation (*Evaporator Eva 600, Alcatel*) à la vitesse de 0,1 nm/s avec une température de dépôt maintenue à 150°C sur une surface de mica préalablement clivé comme indiqué précédemment^{3,7}. La surface est ensuite nettoyée dans une solution de $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_3$ (5 : 1 : 1, v : v : v) pendant 20 secondes avant d'être rincée dans de l'eau milliQ et séchée sous un flux d'azote. 400 μ L de la suspension de

liposomes sont ensuite incubés pendant 30 minutes puis rincés à deux reprises avec du tampon.

Dans le cas de la fusion induite par l'utilisation de l'alpha peptide, 400 μ L de solution d'alpha peptide sont incubés pendant 1 heure sur la surface puis rincés à deux reprises avec du tampon PBS. La surface peut ensuite être étudiée par la technique de microscopie à force atomique.

4.5.2.2. Images AFM

Les images ont été réalisées en utilisant un AFM Nanowizard® III (JPK Instrument, Berlin, Germany) en mode contact. Des pointes AFM commerciales (MLCT-AUHW, Bruker) Si_3N_4 de forme pyramidale recouverte d'Or sur le côté réfléchissant du microlevier et une constante de ressort nominale de 0,01 N / m ont été utilisés. Les surfaces sont balayées à une vitesse de 1-2Hz.

4.5.2.3. Courbes d'indentation

Les courbes de force-distance ont été réalisées en utilisant un AFM Nanowizard® III (JPK Instrument, Berlin, Germany). Des pointes AFM commerciales (MLCT-AUHW, Bruker) Si_3N_4 de forme pyramidale recouverte d'or sur le côté réfléchissant du microlevier et une constante de ressort nominale de 0,01 N / m ont été utilisés.

Les expériences d'indentation ont été réalisées à température ambiante dans un tampon PBS. Une force toujours croissante est appliquée en déplaçant la pointe vers la surface en utilisant le déplacement piézo à une vitesse de 1 μ m/s. Deux forces maximales ont été appliquées, l'une à 1,5 nN et l'autre à 5 nN.

Pour toutes les expériences 1024 courbes force-distance individuelles ont été collectées dans au moins 3 surfaces différentes et 2 zones différentes.

5. Références

1. Xiaowei Li *et al.* An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. **9**, 8549–8554 (2010).
2. Shin, J. & Noireaux, V. Efficient cell-free expression with the endogenous E. Coli RNA polymerase and sigma factor 70. *J. Biol. Eng.* **4**, 8 (2010).
3. Richter, R. P. The Formation of Solid-Supported Lipid Membranes and Two-Dimensional Assembly of Proteins. A Study Combining Atomic Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. (2004).
4. Dixon, M. C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *J. Biomol. Tech. JBT* **19**, 151–158 (2008).
5. Lahmani, M. *Les nanosciences*. (Belin, 2006).
6. Irwin, E. F., Ho, J. E., Kane, S. R. & Healy, K. E. Analysis of Interpenetrating Polymer Networks via Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Langmuir* **21**, 5529–5536 (2005).
7. Voinova, M. V., Rodahl, M., Jonson, M. & Kasemo, B. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys. Scr.* **59**, 391–396 (1999).
8. *Surface design: applications in bioscience and nanotechnology*. (Wiley-VCH, 2009).
9. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 513–526 (1991).
10. Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P. & Kasemo, B. Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **84**, 5443 (2000).
11. Sprague, B. & McNally, J. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol.* **15**, 84–91 (2005).
12. Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R. & Drummen, G. P. C. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* **17**, 4047–4132 (2012).
13. Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. & Kenworthy, A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 444–456 (2001).
14. Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* **41**, 95–97 (1983).
15. Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57–61 (1982).
16. Butt, H.-J. & Jaschke, M. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* **6**, 1–7 (1995).
17. Garcia-Manyes, S. & Sanz, F. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 741–749 (2010).

Partie III : Résultats et Discussion

Chapitre 1 : Incorporation de pores membranaires dans une bicouche phospholipidique supportée (SLB)

Remarques générales

Comme décrit plus largement dans l'introduction, les protéines membranaires intégrales jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité cellulaire (transports d'ions et de nutriments, transduction de signal, interaction cellule-cellule)¹. Afin de les étudier, ces protéines doivent être produites *in vitro*. La production classique de ces protéines membranaires intégrales dans des microorganismes présente de nombreuses difficultés liées à leur structure complexe (faible rendement, agrégation protéique, mauvais repliement) mais aussi des problèmes de toxicité, empêchant la production de nombre d'entre elles². En outre, pour être produites efficacement, ces protéines ont besoin d'un environnement hydrophobe instauré par l'utilisation de détergents ou de molécules lipidiques. Dans cette thèse, afin de pallier à ces difficultés, nous avons choisi d'une part d'utiliser un système d'expression protéique acellulaire (CFPS), non affecté par la physiologie des cellules vivantes^{2,3}. En outre, nous avons choisi de les intégrer dans des bicouches lipidiques planes reconstituées artificiellement. La littérature fait état de plusieurs types de bicouches lipidiques planes existantes : les bicouches lipidiques supportées (SLB)⁴, les bicouches lipidiques espacées et ancrées (tBLM)⁵ mais également les bicouches lipidiques suspendues⁶ (*cf. Partie I : Etat de l'art*). Nous nous sommes intéressés aux bicouches lipidiques supportées formées par fusion de liposomes sur une surface de SiO₂. Ce sont des bicouches lipidiques fluides et robustes espacées de la surface via une couche aqueuse de 1 à 2 nm.

Le but de ce chapitre est de mettre au point une bicouche lipidique supportée et de déterminer les conditions expérimentales nécessaires à la bonne expression et caractérisation des protéines membranaires de type alpha hémolysine⁷ produites par un système d'expression protéique acellulaire en contact avec la SLB.

1. Stratégie de construction de la membrane

Dans ce chapitre nous avons choisi de former des bicouches phospholipidiques à partir d'une fusion de petits liposomes unilamellaires (Small Unilamellar Vesicles)⁷ sur différentes surfaces (SiO₂, verre et mica). La suspension de liposomes sera composée exclusivement de POPC, molécule lipidique synthétique zwitterionique connue pour fusionner sur ces surfaces et fournir une bicouche lipidique supportée avec peu de défauts⁸. La formation de ces SLBs nécessite plusieurs étapes. Dans un premier temps, les suspensions de liposomes devront être préparées. Pour réaliser cette étape, la technique de sonication⁹ utilisant des ultrasons pour casser les liposomes multilamellaires qui se sont formés lors de la mise en solution des molécules lipidiques a été choisie. En effet, d'après les études menées dans la littérature, il a été mis en évidence que la taille des liposomes n'avait pas d'incidence sur la fusion des liposomes sur des surfaces de SiO₂ et de TiO₂¹⁰. La taille des liposomes présents en suspension dans un environnement aqueux est ensuite caractérisée à l'aide d'une technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS)¹¹ (*cf. Partie II : Matériel et méthodes*). Le diamètre moyen relevé est de 107 nm ± 5 nm.

Dans un second temps, les surfaces sur lesquelles les SLBs seront formées doivent être préparées. Si des surfaces de SiO₂ ou de verre sont utilisées, elles devront être rendues hydrophiles à l'aide d'un procédé oxydatif nécessitant l'utilisation d'un plasma à oxygène. En revanche, si c'est du mica, surface hydrophile chargée négativement^{12,13}, qui est utilisé, un clivage préalable de cette surface doit être réalisé (*cf. Partie II : Matériel et méthodes*).

Les suspensions de liposomes obtenues précédemment seront ensuite déposées sur ces différentes surfaces. La formation des SLBs sera caractérisée par 3 techniques : la microbalance à cristal de quartz et à dissipation (QCM-D)¹⁴, le recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP)¹⁵ et la microscopie à force atomique (AFM)¹⁶.

1.1. Caractérisation de la formation de membrane par QCM-D

Dans un premier temps, suite au traitement de surface du quartz recouvert d'une couche métallique de SiO₂, une solution de tampon phosphate (PBS, Phosphate Buffer Saline) de pH 7,4 est injectée par un système microfluidique dans une chambre de QCM-D contenant les quartzs afin de stabiliser les signaux de fréquence de résonance et de dissipation mesurés par cette technique. La température est ajustée à 25°C, condition optimale pour la production de SLBs par fusion de suspensions de liposomes^{17,18}.

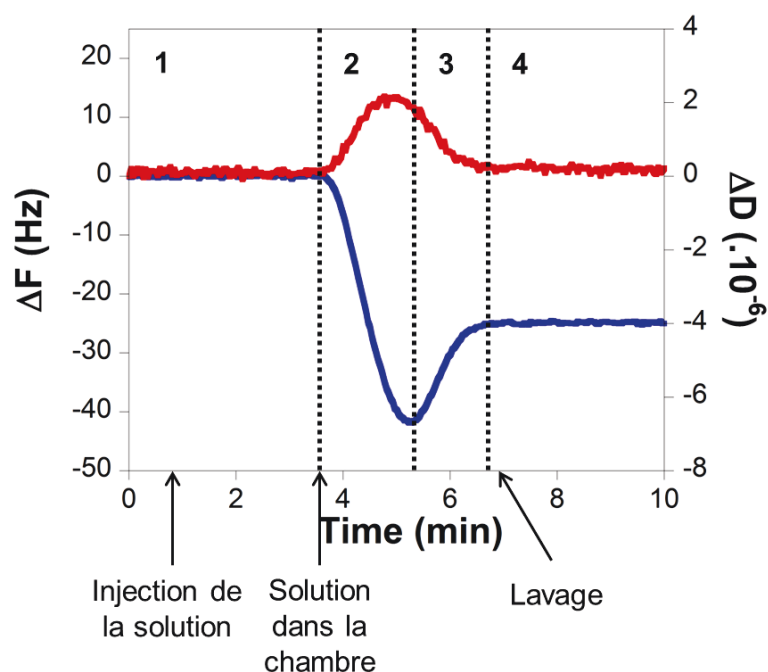


Figure 73 : Formation d'une bicouche phospholipidique avec des liposomes composés de POPC caractérisée par QCM-D. 1) Injection de la solution de liposomes de concentration 0,250 mg/ml à la vitesse de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$; 2) Adsorption de liposomes sur la surface ; 3) Après avoir atteint un seuil critique, les liposomes se rompent et relarguent l'eau qu'ils contenaient ; 4) A la fin de l'expérience, la surface est lavée avec une solution tampon et les signaux se stabilisent.

La suspension de liposomes à la concentration de 0,250 mg/mL est ensuite injectée dans la chambre (Figure 73 (1)) de QCM-D. Après 4 minutes, la suspension de liposomes atteint la chambre de QCM-D dans laquelle est positionné le cristal de quartz de SiO_2 . A partir de cet instant, nous observons une augmentation de la dissipation couplée à une diminution de la fréquence de résonance jusqu'à une valeur de -40 Hz correspondant à une augmentation de la masse adsorbée sur la surface (Figure 1 (2)). Les liposomes étant le seul matériel ajouté sur la surface, la diminution de la fréquence de résonance s'explique par leur adsorption à la surface de SiO_2 . Après que la surface recouverte de liposomes ait atteint son seuil de saturation, une augmentation de la fréquence corrélée à une perte de masse est observée correspondant au relargage d'eau contenu dans les liposomes. Ceci indique que les liposomes se rompent et s'étalent sur la surface permettant la formation à proprement dite d'une bicouche phospholipidique (Figure 73 (3)). Nous procédons ensuite au lavage de la surface avec le tampon afin d'éliminer le matériel qui ne serait pas adsorbé sur la surface. Au cours de cette étape, les valeurs de dissipation et de fréquence se stabilisent. La première est de l'ordre de $0,3 \cdot 10^{-6}$ tandis que la fréquence obtenue est de $-25 \text{ Hz} \pm 1 \text{ Hz}$ (Figure 73 (4)). Ces valeurs correspondent à la formation d'une bicouche lipidique composée de POPC de bonne qualité sur un cristal de quartz SiO_2 ⁸.

Afin de diminuer les coûts expérimentaux, il a été envisagé de réduire la concentration des suspensions de liposomes utilisées. Après une étude des travaux portant sur ce sujet, il s'avère que ceux menés par Richter et coll.¹⁹ ont montré la formation de SLB en utilisant des concentrations de liposomes (DOPC/DOPS 4 :1) de 0,1 mg/mL. Nous avons voulu vérifier que la fusion lipidique s'opérait avec une telle concentration de liposomes composés exclusivement de POPC (Figure 74).

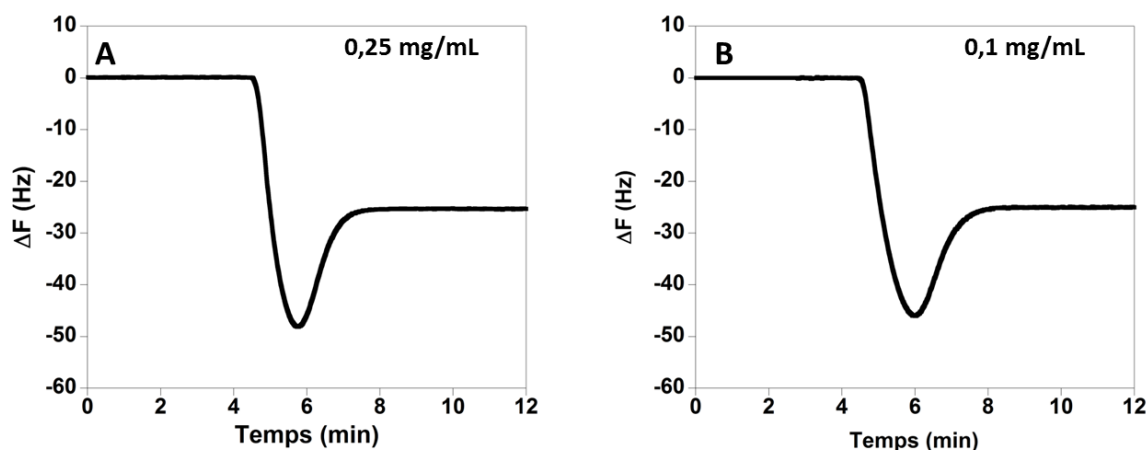


Figure 74: Formation de bicouches lipidiques supportées composées de molécules de POPC fusionnées sur SiO_2 . Concentration des liposomes de 0,25 mg/mL (A) et 0,1 mg/mL (B).

L'allure de la courbe obtenue avec une concentration de liposomes de 0,1 mg/mL est similaire à celle observée avec une concentration de 0,25 mg/mL. Ceci implique que le comportement des liposomes est le même que celui décrit précédemment pour 0,25 mg/mL. Comme les mêmes résultats sont obtenus avec une suspension de liposomes de concentration 0,1 mg/mL, cette dernière condition plus économique sera utilisée pour la suite de ces travaux.

1.2. Caractérisation de la formation d'une SLB par FRAP

Dans le but de confirmer la présence d'une bicouche lipidique supportée, nous nous sommes intéressés à la diffusion latérale au sein de la bicouche lipidique^{20,21}. Cette diffusion latérale peut être caractérisée par la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)^{20,21}. Cette technique repose sur le photo-blanchiment d'une espèce fluorescente à l'aide d'un faisceau laser focalisé sur une zone déterminée à une longueur d'onde de 488 nm, adaptée aux molécules lipidiques fluorescentes (NBD-PC) utilisées. La zone fluorescente déterminée est « photo-blanchie » signifiant que la fluorescence est « éteinte » dans cette zone. La réapparition de la fluorescence est liée à la

diffusion des molécules fluorescentes provenant des régions proches de la région photoblanchie (cf. *Partie II : matériel et méthodes*).

Pour effectuer la caractérisation de la formation de SLB par FRAP, 1% de molécules lipidiques fluorescentes NBD-PC ont été incorporées dans les liposomes lors de leur fabrication. Ces suspensions de liposomes ont été incubées durant 30 minutes sur une surface de verre rendue hydrophile à l'aide d'un traitement par plasma O₂ (Diener (95%, 5 minutes, 1,5 mBar)). Les images avant et après photoblanchiment d'une zone localisée de la bicouche phospholipidique supportée sont montrées à la Figure 75.

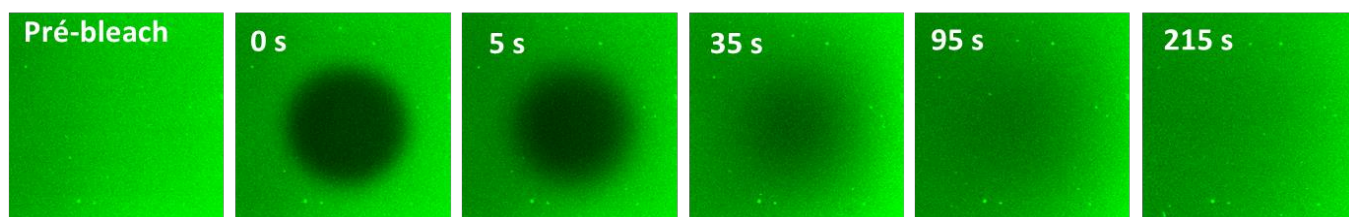


Figure 75 : Images obtenues avec la technique de FRAP sur des suspensions de liposomes de composition 99% POPC / 1% NBD-PC incubées 30 minutes sur une surface de verre hydrophile. Des suspensions de liposomes ont été incubées 30 minutes sur la surface de verre rendue hydrophile par traitement oxydatif (plasma O₂ Diener (95%, 5 minutes, 1,5 mBar)). La surface a ensuite été rincée à deux reprises avec une solution tampon de PBS. Une zone de 40 µm a ensuite été photoblanchie à l'aide d'un faisceau laser de puissance 15 mW à une longueur d'onde de 488 nm. Des images (80 µm x 80 µm) ont été prises avant le photoblanchiment (pré-bleach), juste après (t=0s) puis à 5s, 35s, 95s et 215s. 6 expériences ont été réalisées sur différentes zones et différentes surfaces de verre incubées.

Le photo-blanchiment d'une zone (à t=0s) comportant des liposomes fait apparaître une « tâche » noire indiquant une destruction de la fluorescence de cette région. L'image obtenue après 5 secondes montre la zone photo-blanchie dont les contours apparaissent flous. Après 35 secondes, la zone photo-blanchie n'est quasiment plus visible. Les images obtenues après 95 secondes et 215 secondes sont similaires à celle présentée avant le photo-blanchiment de la zone. Ceci indique qu'un recouvrement complet de la fluorescence a été opéré et donc que les molécules lipidiques déposées sur la surface de verre sont mobiles.

Ces images ont été analysées et traitées à l'aide du logiciel Image J permettant de générer une courbe cinétique du photo-blanchiment (Figure 76). L'analyse de la cinétique de recouvrement de la fluorescence au cours du temps permet de calculer deux paramètres : la fraction mobile et le coefficient de diffusion latéral. La fraction mobile, correspondant aux molécules participant au recouvrement de la fluorescence, est obtenue en faisant le ratio entre la mesure d'intensité de fluorescence à un instant t et la mesure d'intensité de fluorescence initiale. Le coefficient de diffusion latéral, quant à lui, est lié à la vitesse de déplacement des molécules lipidiques. Il est calculé à partir de la relation $D=0,224.r^2/t_{1/2}$ avec « r » le rayon de la zone photoblanchie et $t_{1/2}$ le temps de demi-vie de recouvrement de la fluorescence²² (cf. *Partie II : matériel et méthodes*).

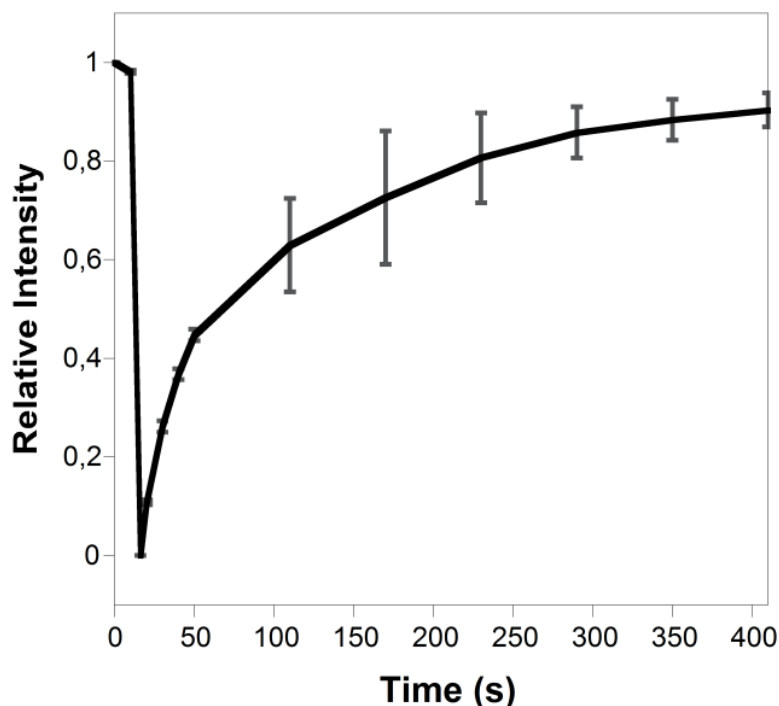


Figure 76 : Cinétique de recouvrement de fluorescence d'une SLB avant et après photoblanchiment.
L'intensité relative moyenne de fluorescence recouvrée en fonction du temps est obtenue à partir des images obtenues avec la technique de FRAP avant et après photoblanchiment d'une zone de 40 μm de liposomes de composition 100% POPC incubés 30 minutes sur une surface de verre rendue hydrophile par un traitement oxydatif effectué avec un plasma O_2 . La moyenne de 5 mesures a été réalisée et la courbe est tracée avec les écart-types (cf : partie II : matériel et méthodes).

Pour une suspension de liposomes de composition 99% de POPC /1% NBD-PC incubée sur une lame de verre rendue hydrophile, une fraction mobile de $92 \pm 4\%$ a été relevée après 400 secondes et un coefficient de diffusion de $1,4 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ a été calculé. Les données de la littérature indiquent que si des liposomes sont adsorbés intacts sur la surface, la fraction mobile relevée est nulle. A l'inverse, si une bicouche lipidique complète est formée, la fraction mobile est de 90-100%²³.

Dans le cadre de nos expériences, une fraction mobile de 92% indique qu'il y a eu formation d'une SLB complète c'est-à-dire recouvrant toute la surface. En outre, un coefficient de $1 \text{ à } 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ est reporté pour des SLBs composées de molécules lipidiques de phosphatidylcholine²⁴, gamme dans laquelle se trouve le coefficient de diffusion calculé dans le cadre de ces expériences. En confrontant nos résultats aux données de la littérature^{23,24}, nous avons confirmé qu'une SLB est formée sur la surface. Les résultats obtenus avec cette technique de FRAP nous apprennent également que cette bicouche lipidique est fluide et qu'elle recouvre toute la surface.

1.3. Caractérisation de la formation d'une SLB par AFM

La troisième technique, que nous avons utilisé pour caractériser la formation d'une SLB est la microscopie à force atomique (AFM). Cette technique permet de déterminer les caractéristiques topographiques de la surface au niveau nanométrique^{25,26}. Pour cela, une suspension de liposomes composée exclusivement de molécules lipidiques de POPC est incubée pendant 30 minutes à température ambiante sur une surface de mica clivée (*cf. Partie II : matériel et méthodes*). Cette surface est ensuite lavée à deux reprises avec une solution tampon de PBS avant d'être imagée avec la technique d'AFM en milieu liquide. Les images sont obtenues en mode contact, dans lequel la pointe reste en contact avec la surface durant le balayage de l'échantillon. L'utilisation de ce mode implique que la force appliquée soit faible (inférieure à 100 pN) afin de limiter les dommages pouvant être causés à l'échantillon analysé.

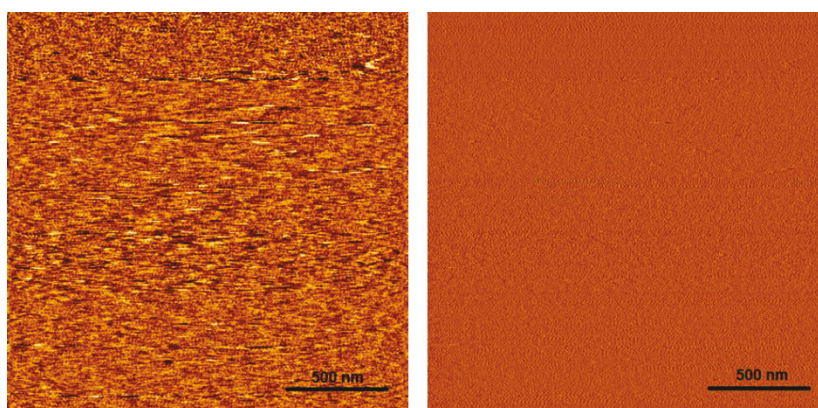


Figure 77: Images de bicouches phospholipidiques de POPC sur une surface de mica obtenue par AFM.
A) Image de hauteur (échelle de couleurs comprise entre 0 et 0,2 nm) ; B) Image de déflexion verticale.
La surface est balayée avec une vitesse de 2 Hz avec une pointe AFM commerciale (MLCT-AUHW, Bruker) en Si_3N_4 de forme pyramidale recouverte d'Or sur le côté réfléchissant du microlevier et une constante de ressort nominale de 0,01 N / m.

Une image de hauteur caractérisant la topographie de la surface et une image de déflexion verticale faisant ressortir les détails de la surface sont obtenues (Figure 77). Une surface homogène plane sans défaut apparent est observée. Cette observation est en accord avec la formation d'une bicouche lipidique formée sur une surface de mica, confirmant ainsi les résultats obtenus avec les précédentes techniques utilisées (QCM-D et FRAP).

1.4. Formation d'une SLB : conclusion

La formation d'une SLB a été caractérisée par trois techniques : la QCM-D, le FRAP et l'AFM. Grâce à la QCM-D, nous avons obtenu une valeur de fréquence de résonance de $-25 \text{ Hz} \pm 1 \text{ Hz}$, correspondant à une valeur caractéristique de la formation d'une bicouche lipidique supportée⁸. La technique de FRAP a confirmé que les molécules lipidiques sont extrêmement mobiles (92 %), ce qui est caractéristique d'une bicouche lipidique plane complète. Enfin, la microscopie par force atomique a montré que la surface est homogène et plane.

2. Insertion de pores membranaires dans une bicouche lipidique supportée (SLB)

2.1. Choix de l'Alpha Hémolysine et de l'Alpha Hémolysine-eGFP

Ayant atteint notre premier objectif de formation d'une bicouche lipidique supportée (SLB) sur une surface de SiO_2 , nous nous sommes ensuite intéressés à l'insertion de protéines membranaires produites par un système d'expression protéique acellulaire (CFPS), qui nous a été fourni par Vincent Noireaux (Université du Minnesota, Minneapolis), dans ces SLBs. Pour rappel, ce système d'expression protéique acellulaire permet de coupler les étapes de transcription et de traduction qui vont directement synthétiser les protéines sans nécessiter la conservation de cellules et la croissance cellulaire. Du fait de la faible distance entre la bicouche phospholipidique supportée et le support plan de 1 à 2 nm²⁴, nous avons choisi de produire l'alpha hémolysine qui est une protéine formant des pores, dont la structure en 3D de la protéine se trouve localisée d'un seul côté de la bicouche lipidique. Comme le montre la Figure 78, cette protéine de 35 kDa présente une structure qui se compose d'un capuchon situé dans la partie extracellulaire et d'une queue intégrée dans la membrane. La même protéine fusionnée à la protéine eGFP (alpha-hémolysine-eGFP) de masse moléculaire de 61,4k a également été utilisée dans ce travail.

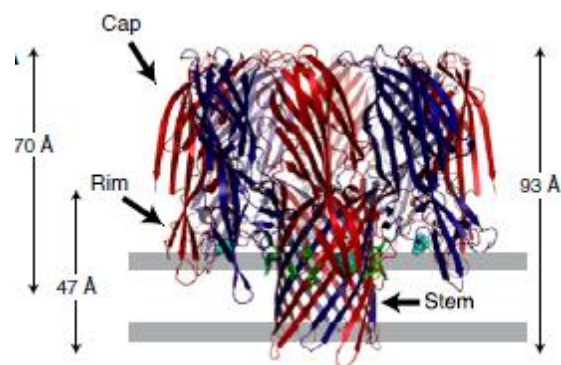


Figure 78 : Représentation de la structure de l'alpha hémolysine²⁷. La bicouche membranaire est localisée ainsi que le domaine du capuchon, les 7 domaines de l'anneau et celui de la queue

2.2. Production et incorporation de protéines membranaires

2.2.1. Vérification de la production des protéines

Nous avons vérifié que les protéines d'intérêt étaient exprimées. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs solutions de CFPS dans des tubes eppendorf en ajoutant ou non l'ADN plasmidique portant le gène codant pour la protéine d'intérêt. Ces tubes ont été placés pendant 12 heures dans un incubateur à 30°C qui est la température optimale pour l'expression protéique par le système CFPS²⁸. Un aliquote des solutions d'alpha hémolysine, d'alpha hémolysine-eGFP et d'un témoin (sans ADN plasmidique ajouté) a été déposé sur un gel de polyacrylamide, selon le protocole décrit dans la *Partie II : matériel et méthodes*. Le résultat de cette expérience est illustré à la Figure 79.

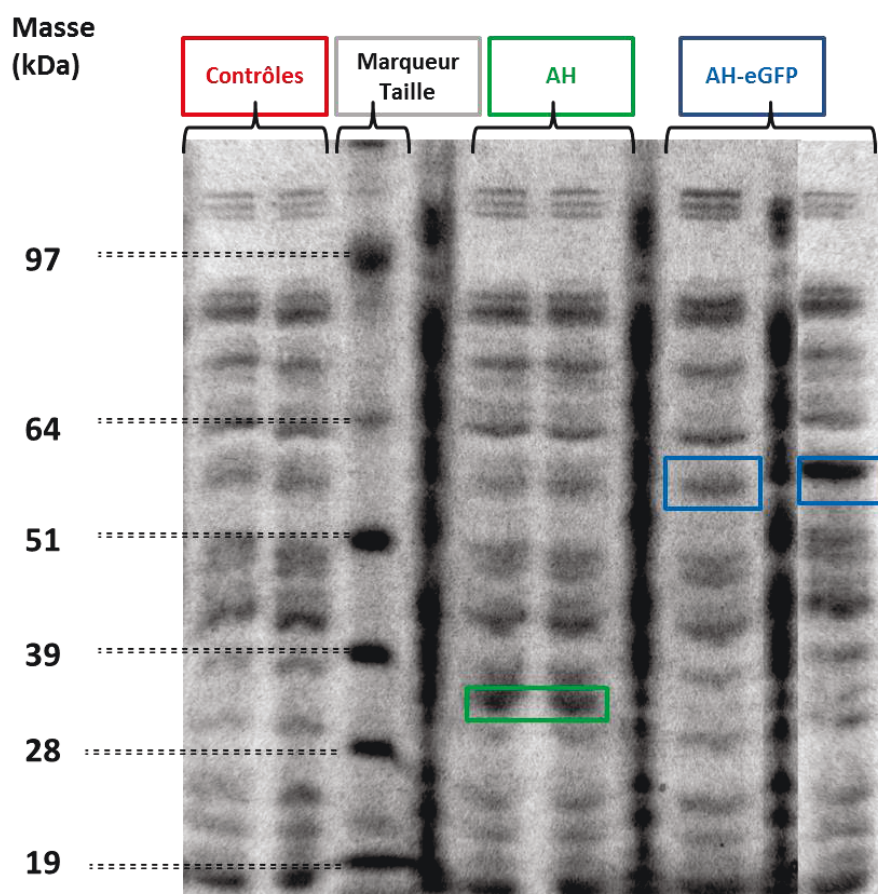


Figure 79 : Gel d'électrophorèse de protéines issu du système CFPS exprimant les protéines alpha hémolysine et alpha hémolysine eGFP. Le contrôle présenté correspond au système CFPS dans lequel n'a pas été ajouté d'ADN plasmidique. Les protéines ont été produites par un système d'expression protéique acellulaire durant 12 heures dans des tubes eppendorfs à 29°C. La migration des protéines a été réalisée sur un gel de polyacrylamide (kit NuPage Bis Tris 4-12% d'Invitrogen).

De nombreuses bandes apparaissent sur le gel lors de la migration, indiquant comme attendu la présence de nombreuses protéines appartenant notamment à la machinerie de transcription et de traduction protéique. Une comparaison de l'ensemble de ces bandes protéiques obtenues avec le CFPS portant le plasmide contenant les gènes codant pour l'AH (CFPS « AH ») et l'AH-eGFP (CFPS « AH-eGFP ») avec le CFPS « témoin » montre qu'une bande supplémentaire d'environ 30 kDa est présente pour l'AH et à 60 kDa pour l'AH-eGFP. La masse moléculaire théorique de l'AH étant de 35 kDa et celle de l'AH-eGFP de 61,4 kDa, la présence de ces bandes protéiques supplémentaires indiquent que l'AH et l'AH-eGFP ont été produites par le CFPS.

Ce résultat indique que le système d'expression acellulaire produit les deux protéines d'intérêt (alpha hémolysine et alpha hémolysine-eGFP). En revanche, la quantité de protéines produites est difficilement quantifiable en raison des nombreuses impuretés dans l'extrait total.

2.2.2. Caractérisation de la production et de l'incorporation des pores membranaires par QCM-D.

Nous avons confirmé à l'aide de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide que les protéines (alpha hémolysine et alpha hémolysine-eGFP) sont produites par le système CFPS. A l'aide de la technique de QCM-D, nous devons ensuite déterminer si ces protéines sont produites et peuvent s'incorporer dans la bicouche phospholipidique supportée préalablement formée (Figure 80).

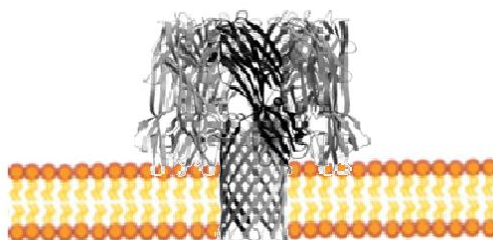


Figure 80 : Schéma représentatif de l'insertion d'une protéine d'alpha hémolysine dans une bicouche lipidique supportée (SLB)

Après la formation de la bicouche phospholipidique, la température des chambres de QCM-D est ajustée à 30°C correspondant à la température optimale d'expression protéique du CFPS lors des conditions de production protéique en mode batch, c'est-à-dire sans addition supplémentaire de milieu réactionnel²⁸. Les deux solutions d'expression (alpha-hémolysine et alpha-hémolysine-eGFP) sont injectées dans deux chambres de la QCM-D. Une solution témoin, contenant le système d'expression protéique acellulaire sans ajout de d'ADN plasmidique, est également injectée dans une troisième chambre. Dès que la solution est dans la chambre de QCM-D, le flux est stoppé durant 3 h laissant la solution de CFPS sur la bicouche lipidique afin de permettre la production de la protéine.

Les changements de la fréquence de résonance ont été enregistrés en temps réel. Les informations recueillies sont montrées dans la Figure 81.

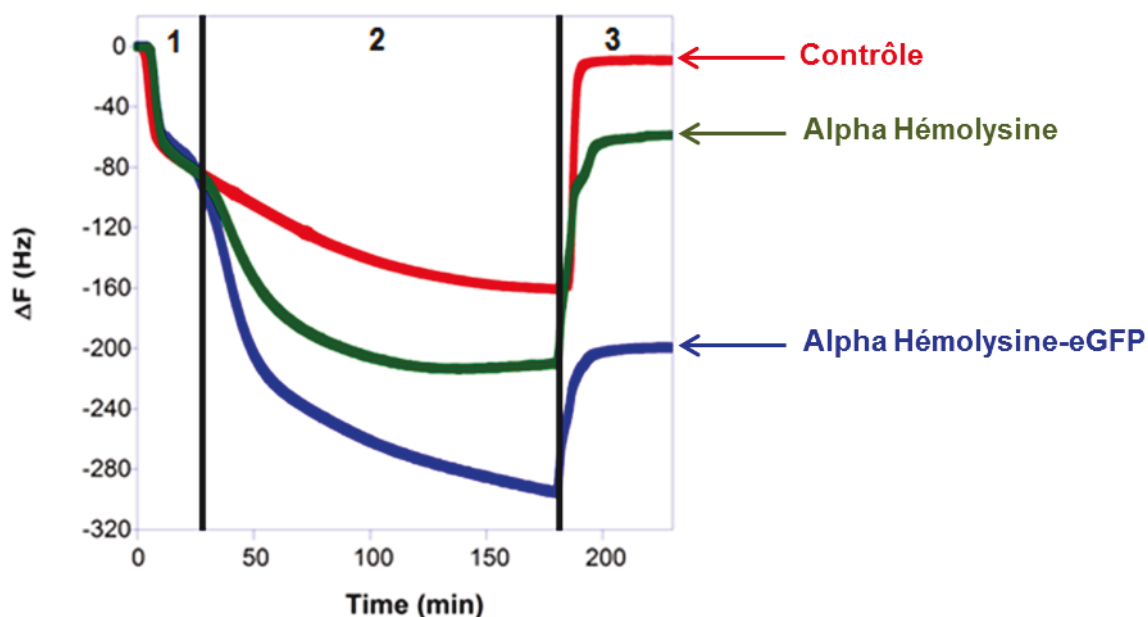


Figure 81: Adsorption des protéines alpha hémolysine et alpha hémolysine-eGFP produites par un système d'expression acellulaire ainsi que le contrôle sur une bicouche phospholipidique supportée (SLB) mesurées par QCM-D. (1) Ajout du matériel CFPS sur la SLB suivi de la production de protéines par le système CFPS (2) avant rinçage et stabilisation des signaux (3).

Une diminution de la fréquence de résonance de l'ordre de -60 Hz est observée suite à l'arrivée des solutions de CFPS (Figure 81.1). Lors de l'ajout du CFPS (sans ADN plasmidique ajouté dans la solution) servant de témoin sur une SLB, une décroissance de la fréquence de résonance est ensuite observée. Après 3h d'expression protéique, la valeur de la variation de fréquence de résonance relevée est de -160 Hz. Il s'ensuit une étape de lavage avec la solution tampon (PBS), dans le but d'éliminer le matériel biologique provenant des solutions de CFPS non adsorbé sur la surface de la SLB. Lors de ce lavage, une remontée rapide de la fréquence de résonance jusqu'à atteindre une valeur de 0 Hz est relevée indiquant que le matériel du système d'expression protéique acellulaire a été éliminé. Ceci permet de proposer qu'il n'y a pas de protéines du CFPS qui s'insèrent ou sont retenues sur les SLBs).

Lors de l'ajout de solutions de CFPS induisant la production d'alpha hémolysine (AH) et alpha hémolysine-eGFP (AH-eGFP), la fréquence de résonance diminue. Après 3 h, la valeur de fréquence de résonance mesurées est de -210 Hz pour l'AH et de -300 Hz pour l'AH-eGFP. Comme pour la courbe témoin, un lavage est opéré induisant une forte et rapide remontée de la fréquence jusqu'à atteindre la valeur de -60 Hz pour l'AH et de -200 Hz pour l'AH-eGFP. Ceci indique que les protéines alpha-hémolysine et alpha hémolysine-eGFP ont été produites et qu'elles sont restées liées à la bicouche lipidique supportée. Nous notons également que la variation de fréquence est plus importante pour l'AH-eGFP signifiant qu'une masse plus importante est adsorbée.

Cette différence peut être mise en relation avec le fait que la masse d'AH-eGFP est deux fois plus lourde que celle de AH (AH 35kDa et AH-eGFP 61,4 kDa). Donc, la différence observée serait due à la fois à la différence de masse protéique mais aussi au fait qu'il y aurait 1,5 fois plus de production et d'incorporation de AH-eGFP que de AH.

La technique de QCM-D fournit également des informations sur les propriétés viscoélastiques des éléments ajoutés sur la surface^{29,30} en mesurant les variations de dissipation d'énergie au cours du temps (Figure 82).

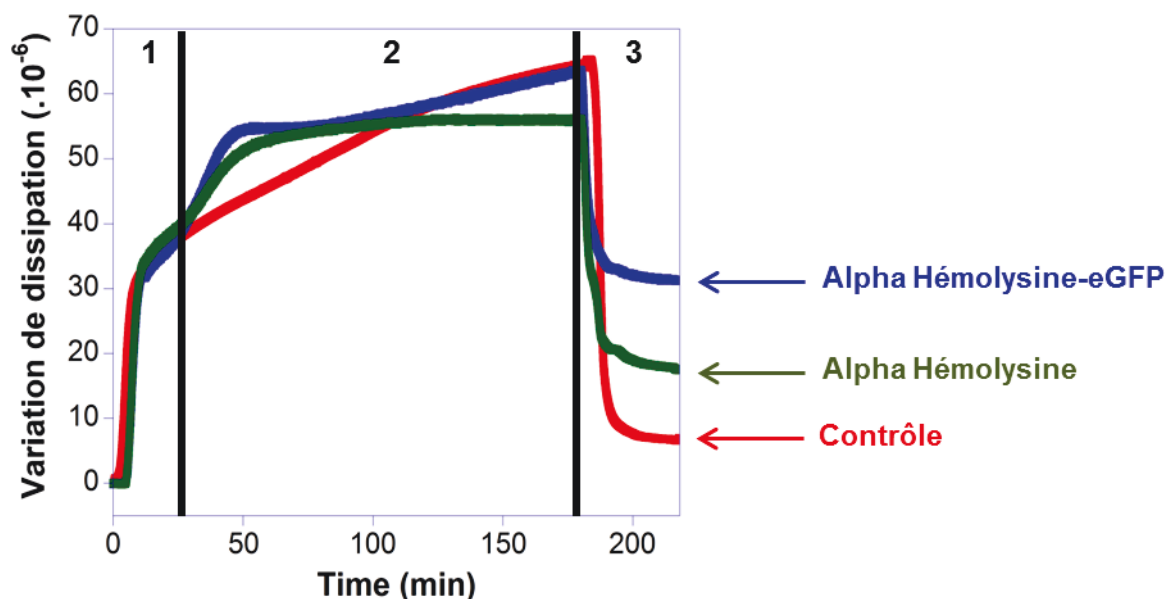


Figure 82 : Variation de dissipation mesurée par QCM-D lors de l'absorption de protéines alpha hémolysine et alpha hémolysine-eGFP produites par un système d'expression acellulaire ainsi que le contrôle sur une bicouche phospholipidique supportée (SLB).

Lors de l'injection des trois solutions de CFPS (« témoin », « AH » et « AH-eGFP »), une augmentation brutale de la dissipation d'énergie de $40 \cdot 10^{-6}$ est observée durant les 30 premières minutes d'expérience. Ce changement de dissipation d'énergie correspond à l'ajout du matériel du système d'expression acellulaire sur la surface. La dissipation d'énergie augmente ensuite continuellement pendant 2 h 30. Après 3 h d'expression protéique, les valeurs mesurées pour l'AH ($\Delta D = 56 \cdot 10^{-6}$), l'AH-eGFP ($\Delta D = 64 \cdot 10^{-6}$) et le témoin ($\Delta D = 63 \cdot 10^{-6}$) sont du même ordre de grandeur. Ces valeurs indiquent que lors de l'ajout des solutions de CFPS et de l'expression protéique, l'énergie dissipée est très importante. En effet, en s'intéressant aux données de la littérature, les valeurs obtenues lors de ces expériences sont au moins sept fois supérieures à celles décrites pour des protéines purifiées de type Mepf1³¹. En revanche, elles sont en accord avec les résultats de Chalmeau et coll.³² utilisant un système d'expression protéique acellulaire pour produire une protéine sur une SLB. Après le lavage effectué avec une solution tampon de PBS, les valeurs de dissipation mesurées chutent brutalement. Les valeurs de dissipation mesurées en fin

d'expérience sont pour l'AH de 18.10^{-6} , pour l'AH-eGFP de 33.10^{-6} et pour le témoin de 4.10^{-6} . Le lavage induit donc un changement de dissipation. Ces résultats indiquent des modifications viscoélastiques de la surface. Afin de mieux appréhender les changements de propriétés viscoélastiques, la variation de dissipation est exprimée en fonction de la variation de fréquence de résonance (Figure 83).

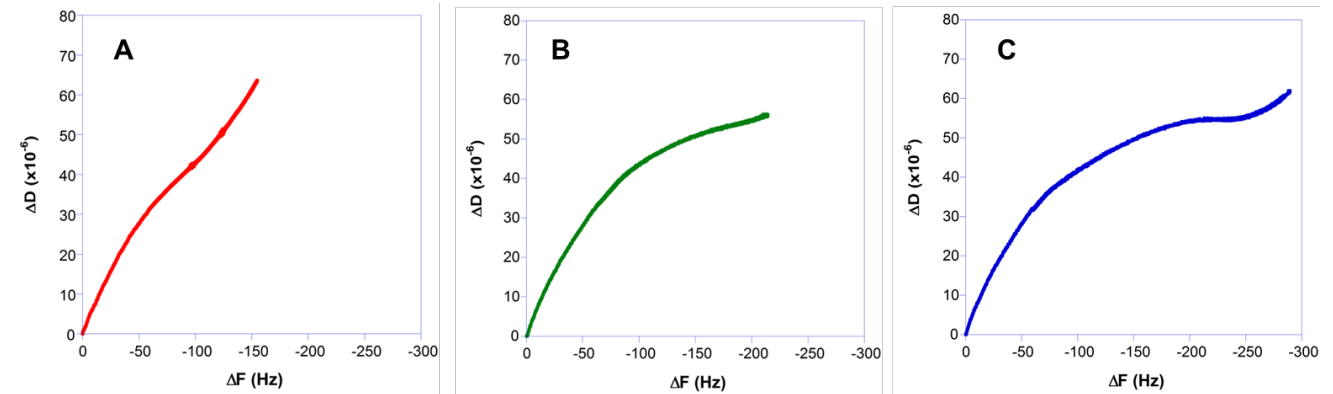


Figure 83 : Variation de la dissipation en fonction des fréquences de résonances enregistrées par la QCM-D. En rouge : le contrôle, en vert : l'AH et en bleu : l'AH-eGFP.

Cette représentation (Figure 83) permet d'appréhender les propriétés viscoélastiques du matériel ajouté sur la surface du quartz. Dans ce type de graphique, lorsque la variation de la dissipation varie moins que celle de la fréquence de résonance (faible pente), cela indique l'existence d'une couche plus faiblement viscoélastique que l'on pourrait qualifier de plus « rigide ». Dans le cas contraire, une augmentation de la pente est synonyme d'une couche plus « molle ».

Sur le graphique correspondant au témoin (Figure 83 A), une pente (de 0 à -150 Hz) pour laquelle la variation de la dissipation varie plus que celle de la fréquence de résonance est observée indiquant la présence d'une couche fortement viscoélastique. En revanche, sur les graphiques correspondant à l'AH et l'AH-eGFP deux phases peuvent être distinguées : une première phase (de 0 à -100 Hz pour l'AH et de 0 à -80 Hz pour l'AH-eGFP) dans laquelle la variation de dissipation augmente rapidement et une seconde phase (de -100 à -210 Hz pour l'AH et de -80 à -200 Hz pour l'AH-eGFP) où une augmentation faible de la dissipation est constatée. Pour ces deux graphiques, une phase fortement viscoélastique dite « molle » est donc observée suivie d'une phase de « rigidification » de la surface (de la masse étant ajoutée sur la surface mais sans réel changement de la dissipation). Cette seconde phase est interprétée comme étant la signature de l'incorporation des complexes protéiques d'alpha hémolysine et d'alpha hémolysine-eGFP au sein de la bicouche phospholipidique. En effet, l'incorporation de protéines dans la bicouche lipidique supportée semble contraindre la bicouche lipidique, celle-ci devenant « rigide ».

2.3. Optimisation des paramètres du CFPS

2.3.1. Temps d'incubation du CFPS sur une SLB

Nous avons montré que la production de protéines par un système de CFPS ainsi que leur incorporation dans une SLB peuvent être suivies en temps réel par la technique de QCM-D. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence du temps d'incubation du système d'expression protéique sur la production de protéines et leur incorporation dans la SLB. Pour y répondre, des expériences à trois temps d'expression protéiques (3 h, 7 h 30 et 16 h) ont été réalisées et les mesures de variation de fréquence de résonance ont été effectuées (Tableau 6).

Temps d'expression	Protéines : mesures avant lavage			Protéines : mesures après lavage		
	AH	AH-eGFP	Rapport AH-eGFP / AH	AH	AH-eGFP	Rapport AH-eGFP / AH
3h	-201 Hz	-303 Hz	1,5	-53 Hz	-200 Hz	3,7
7h30	-250 Hz	-404 Hz	1,6	-135 Hz	-305 Hz	2,3
16h	-277 Hz	-436 Hz	1,6	-144 Hz	-333 Hz	2,3

Tableau 6: Comparaison des résultats d'expression et incorporation de protéines à une température de 30°C pour trois temps d'incubation différents (3h, 7h30 et 16h). Les valeurs présentées dans ce tableau sont celles mesurées avec la technique de QCM-D après 3h d'expression protéique et celles après le lavage effectuée avec une solution tampon de PBS, pH 7,4.

Après 3 h, 7 h 30 et 16 h d'incubation du CFPS, il est observé que plus le temps d'expression augmente et plus la fréquence de résonance mesurée est grande (ΔF de -201 Hz à -277 Hz pour l'AH et ΔF de -303 Hz à -436 Hz pour l'AH-eGFP). Le temps d'expression a de ce fait une incidence sur les fréquences de résonance mesurées. Ceci signifie que la masse adsorbée est plus importante et donc que la quantité de protéines produites par le système CFPS peut s'étendre sur 16h.

Nous notons qu'entre 3 h et 7 h 30 les valeurs de fréquences de résonance mesurées pour les deux protéines augmentent d'un facteur 1,3 fois tandis qu'entre 7 h 30 et 16 h, elle augmente d'un facteur 1,1 indiquant que l'efficacité du système d'expression protéique acellulaire diminue quand le temps d'incubation sur la SLB est plus important. Cette observation pourrait s'expliquer par une limitation du système d'expression en éléments énergétiques nécessaire à l'expression. En effet, aucune réalimentation n'est opérée au cours de l'expérience, le système pouvant être qualifié de « fermé ». Il y a donc un appauvrissement en éléments essentiels aux étapes de transcription et de traduction.

Nous constatons que la fréquence de résonance de l'AH-eGFP est 1,6 fois plus importante que pour l'AH. Il y a donc plus de masse adsorbée pour l'AH-eGFP. Ce ratio est comparable à celui calculé de 1,7 pour le rapport de leurs masses molaires (les masses moléculaires étant de 35 kDa pour l'AH et de 61,4 kDa pour l'AH-eGFP). La différence de fréquence de résonance observée est donc liée à leur masse molaire. La quantité de protéines produites est donc du même ordre de grandeur.

Après le lavage des surfaces avec une solution tampon de PBS, l'augmentation du temps d'expression protéique induit une augmentation de la fréquence de résonance (ΔF de -53 Hz à -144 Hz pour l'AH et ΔF de -200 Hz à -333 Hz pour l'AH-eGFP). Ceci signifie que la masse adsorbée est plus importante quand le temps d'incubation est allongé et donc que la quantité de protéines incorporées dans la SLB est plus grande.

En conclusion, ces résultats montrent que la production et l'incorporation de protéines dans la bicouche phospholipidique sont affectées par ce changement de temps d'expression. Néanmoins, les mesures effectuées pour un temps d'expression de 3 heures avec la QCM-D étant suffisantes pour obtenir des résultats exploitables, nous avons choisi ce temps d'expression dans la suite de ce travail.

2.3.2. Température d'expression protéique

La température de 30°C avait été choisie pour respecter la gamme de température de connue pour être optimale dans des conditions d'expression en mode batch. Néanmoins, la question de la température optimale d'expression protéique dans les conditions d'incubation sur une SLB se pose. C'est pourquoi des expériences de QCM-D ont été menées à 25°C, 30°C et 37°C pour des temps d'expression de 3 h (Tableau 7). Toutefois, une limite technique est atteinte à 37°C en raison de la formation de bulles qui apparaît dans les tuyaux amenant le flux à la chambre de mesure.

Température	Protéines : mesures avant lavage			Protéines : mesures après lavage		
	AH	AH-eGFP	Rapport AH-eGFP / AH	AH	AH-eGFP	Rapport AH-eGFP / AH
25°C	-213 Hz	-246 Hz	1,2	-62 Hz	-117 Hz	1,9
30°C	-201 Hz	-303 Hz	1,5	-53 Hz	-200 Hz	3,7

Tableau 7: Comparaison des résultats d'expression et incorporation de protéines durant une période d'incubation de 3h pour deux températures différentes (25°C, 30°C) sur une SLB de composition 100% de POPC. Les valeurs présentées dans ce tableau sont celles mesurées avec la technique de QCM-D après 3h d'expression protéique et celles après le lavage effectuée avec une solution tampon de PBS, pH 7,4.

Les valeurs répertoriées dans ce tableau lors de l'incubation de solutions de CFPS contenant le plasmide portant le gène codant pour l'AH sur des SLBs après 3 h d'expression protéique montrent des résultats similaires à 25°C ($\Delta f = -213$ Hz) et à 30°C ($\Delta f = -201$ Hz). En revanche, pour l'AH-eGFP, le passage de température de 25°C à 30°C entraîne une plus forte diminution de la variation de fréquence de résonance mesurées d'environ 23 % suggérant que plus de protéines AH-eGFP sont exprimées par le CFPS à 30°C qu'à 25°C. Après le lavage des surfaces avec une solution tampon de PBS, les valeurs relevées pour une solution de CFPS portant le gène codant pour l'AH sont du même ordre de grandeur pour les températures de 25°C et 30°C. En revanche, pour l'AH-eGFP une augmentation de la fréquence de résonance pour une température d'expression protéique de 30°C est visible (-117 Hz à 25°C et -200 Hz à 30°C). Si nous considérons le rapport entre les protéines AH-eGFP / AH, pour une température de 25°C, il est du même ordre de grandeur que le rapport de 2 entre les masses molaires de ces deux protéines. En revanche, pour une température de 30°C, il est deux fois supérieur indiquant qu'il y a plus d'AH-eGFP produites et/ou liées à la surface de la SLB.

Les résultats montrent que la qualité et la quantité de protéines alpha hémolysine produites au sein de la bicouche phospholipidique ne sont pas affectées par ce changement de température. Elle a en revanche un effet positif sur l'expression de l'alpha hémolysine-eGFP possiblement parce que la protéine AH-eGFP est plus longue à traduire. Néanmoins, 30°C est la température appropriée pour l'expression de ces deux protéines. C'est cette température qui sera utilisée dans la suite de nos travaux.

3. Conclusion générale

Ce chapitre avait pour objectif de déterminer les conditions expérimentales d'incorporation de protéines membranaires dans une bicouche lipidique supportée (SLB).

Nous avons caractérisé la production d'une SLB par une utilisation combinée de 3 techniques : QCM-D, FRAP et AFM. Cette SLB est fabriquée à partir de solutions de liposomes de POPC de concentration 0,1 mg/mL dans un tampon PBS à pH 7,4 sur des surfaces de SiO₂ et de verre modifiées par traitement oxydatif mais aussi sur des surfaces de mica.

Nous nous sommes ensuite focalisés sur la production de protéines membranaires de type « pore » par le CFPS au sein de cette SLB. La caractérisation par QCM-D a mis en évidence une différence de comportement entre des solutions « contrôle » et celles exprimant les protéines. En effet, grâce aux lavages des surfaces, nous avons constaté que la valeur de fréquence de résonance du contrôle est proche de 0 Hz à la différence des protéines d'intérêt étudiées. Tous ces éléments nous suggèrent une incorporation de ces protéines membranaires dans la SLB. Néanmoins, ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer qu'elles sont bien insérées, bien conformées et donc fonctionnelles dans les bicouches lipidiques supportées.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la température et le temps d'incubation du CFPS sur la production et incorporation de protéines sur une SLB. Il s'est avéré que la température optimale est de l'ordre de 30°C et que la production de protéines se ralentit après un temps d'expression de 16 heures. Néanmoins, le temps d'expression que nous choisissons d'utiliser dans la suite de cette étude sera de 3 heures. En effet, après 3 heures d'expression protéique, les mesures obtenues avec la technique de QCM-D sont suffisantes pour obtenir des résultats exploitables et comparables. Ce temps d'expression présente de plus l'avantage de réaliser des expériences sur une journée.

4. Références

1. Shechter, E. *Biochimie et biophysique des membranes: aspects structuraux et fonctionnels*. (Masson, 1997).
2. Goerke, A. R. & Swartz, J. R. Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 351–367 (2008).
3. Noireaux, V., Bar-Ziv, R., Godefroy, J., Salman, H. & Libchaber, A. Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles. *Phys. Biol.* **2**, P1–P8 (2005).
4. Tamm, L. K. & McConnell, H. M. Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **47**, 105–113 (1985).
5. Jackman, J., Knoll, W. & Cho, N.-J. Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes. *Materials* **5**, 2637–2657 (2012).
6. Zagnoni, M. Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab. Chip* **12**, 1026–1039 (2012).
7. Lin, C.-M., Li, C.-S., Sheng, Y.-J., Wu, D. T. & Tsao, H.-K. Size-Dependent Properties of Small Unilamellar Vesicles Formed by Model Lipids. *Langmuir* **28**, 689–700 (2012).
8. Keller, C. A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* **75**, 1397–1402 (1998).
9. D D Lasic. The mechanism of vesicle formation. *Biochem J* **256**, 1–11 (1988).
10. Reimhult, E., Hook, F. & Kasemo, B. Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size. *J. Chem. Phys.* **117**, 7401–7404 (2002).
11. Goldberg, W. I. Dynamic light scattering. *Am. J. Phys.* **67**, 1152 (1999).
12. Liang, X., Mao, G. & Simon Ng, K. Y. Probing small unilamellar EggPC vesicles on mica surface by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **34**, 41–51 (2004).
13. Leonenko, Z. ., Carnini, A. & Cramb, D. . Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1509**, 131–147 (2000).
14. Dixon, M. C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *J. Biomol. Tech. JBT* **19**, 151–158 (2008).
15. Ishikawa, K., Sato, K., Shima, Y., Urabe, I. & Yomo, T. Expression of a cascading genetic network within liposomes. *FEBS Lett.* **576**, 387–390 (2004).
16. Garcia-Manyes, S. & Sanz, F. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 741–749 (2010).
17. Reimhult, E., Höök, F. & Kasemo, B. Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure[†]. *Langmuir* **19**, 1681–1691 (2003).
18. Richter, R., Mukhopadhyay, A. & Brisson, A. Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophys. J.* **85**, 3035–3047 (2003).
19. Richter, R. P. & Brisson, A. R. Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. *Biophys. J.* **88**, 3422–3433 (2005).
20. Luckey, M. *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations*. (Cambridge University Press, 2008).
21. Pucadyil, T. J., Mukherjee, S. & Chattopadhyay, A. Organization and Dynamics of NBD-Labeled Lipids in Membranes Analyzed by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *J. Phys. Chem. B* **111**, 1975–1983 (2007).
22. Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* **41**, 95–97 (1983).
23. Merz, C., Knoll, W., Textor, M. & Reimhult, E. Formation of supported bacterial lipid membrane mimics. *Biointerphases* **3**, FA41 (2008).

24. Castellana, E. T. & Cremer, P. S. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surf. Sci. Rep.* **61**, 429–444 (2006).
25. Doménech, Ò., Merino-Montero, S., Montero, M. T. & Hernández-Borrell, J. Surface planar bilayers of phospholipids used in protein membrane reconstitution: An atomic force microscopy study. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **47**, 102–106 (2006).
26. Richter, R. P., Bérat, R. & Brisson, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* **22**, 3497–3505 (2006).
27. Yamashita, K. *et al.* Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal α -hemolysin reveals the α -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17314–17319 (2011).
28. Shin, J. & Noireaux, V. Efficient cell-free expression with the endogenous E. Coli RNA polymerase and sigma factor 70. *J. Biol. Eng.* **4**, 8 (2010).
29. Feiler, A. A., Sahlholm, A., Sandberg, T. & Caldwell, K. D. Adsorption and viscoelastic properties of fractionated mucin (BSM) and bovine serum albumin (BSA) studied with quartz crystal microbalance (QCM-D). *J. Colloid Interface Sci.* **315**, 475–481 (2007).
30. Glasmästar, K., Larsson, C., Höök, F. & Kasemo, B. Protein Adsorption on Supported Phospholipid Bilayers. *J. Colloid Interface Sci.* **246**, 40–47 (2002).
31. Berglin, M., Hedlund, J., Fant, C. & Elwing, H. Use of Surface-Sensitive Methods for the Study of Adsorption and Cross-Linking of Marine Bioadhesives. *J. Adhes.* **81**, 805–822 (2005).
32. Chalmeau, J., Monina, N., Shin, J., Vieu, C. & Noireaux, V. α -Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 271–278 (2011).

Chapitre 2 : Incorporation de protéines membranaires dans une bicouche lipidique espacées et ancrées (tBLMs)

Dans le chapitre précédent deux protéines, l'alpha hémolysine et l'alpha-hémolysine-eGFP produite à l'aide d'un système d'expression protéique acellulaire (CFPS) ont été incorporées dans des bicouches lipidiques supportées (SLB). L'incorporation de ces protéines présente la particularité de ne pas requérir d'espace important entre la bicouche lipidique et la surface. Ceci n'est pas le cas de la majorité des protéines membranaires intégrales. Pour pouvoir étudier un plus grand nombre de protéines membranaires intégrales, il nous faut espacer significativement la bicouche lipidique de la surface. Pour cela, nous avons pour but de mettre au point une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM) (Figure 84).

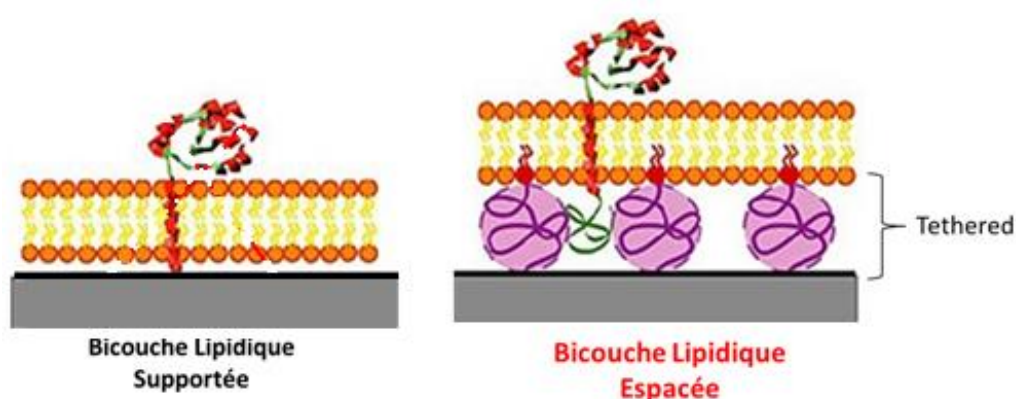


Figure 84 : Représentation schématisée d'une bicouche lipidique supportée (SLB) et d'une bicouche lipidique espacée (tBLM) d'après http://faculty.virginia.edu/tamm/pages/project_support.html

1. Formation de tBLMs sur surface de SiO₂

Au contraire de la formation de SLB utilisant couramment la fusion lipidique, la plupart des procédés à l'origine de la formation de tBLM sont basés sur l'utilisation de la technique de Langmuir-Blodgett pour former une première monocouche lipidique couplée soit à celle de Langmuir-Schaeffer, soit à la fusion directe de liposomes pour former la seconde monocouche lipidique (*cf. Partie I : état de l'art*).

La plupart des travaux dont nous avons eu connaissance à travers la littérature scientifique abordent cette question en se servant de polyéthylène glycol (PEG¹). L'équipe de Reimhult et coll.² a notamment montré que des liposomes composés avec différents ratios molaires de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (appelé par la suite PEG-OCH₃) utilisé comme espaceur et de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (POPC) fusionnent pour former une tBLM sur une surface de SiO₂. Néanmoins, ces travaux ne font pas état de l'incorporation de protéines dans ces tBLMs. Partant de cet exemple, nous avons choisi de former une tBLM avec les mêmes

composés et d'y incorporer des protéines membranaires (Aquaporine Z)³⁻⁶ en utilisant le système de production protéique acellulaire (CFPS).

1.1. Stratégie de formation de tBLM avec l'espaceur PEG-OCH₃ sur SiO₂

1.1.1. Formation d'une tBLM

Dans le but de former une tBLM, ce PEG-OCH₃ est mélangé avec des molécules lipidiques de POPC selon le ratio molaire 0,5 % / 99,5 %. Le ratio molaire du mélange PEG-OCH₃ et POPC conditionne la configuration du PEG, elle est dite « mushroom » ou « brush ». Le mode « brush » dans lequel les molécules de polyethylene glycol (PEG) sont dépliées, est souvent utilisé comme barrière protectrice contre l'adsorption de protéines du fait de son effet répulsif sur les molécules ajoutées à leur surface^{7,8}. A contrario, la configuration dite « mushroom » des polyethylene glycol (PEG), qui nous intéresse dans ce travail, permet une incorporation de protéines à la surface⁹.

Dans cette partie nous comparons le comportement des suspensions de liposomes composées de PEG-OCH₃ sur une surface de SiO₂, rendue hydrophile par traitement oxydatif réalisé à l'aide d'un traitement par plasma O₂, avec celui de liposomes composés uniquement de POPC, en temps réel à l'aide de la QCM-D (Figure 85).

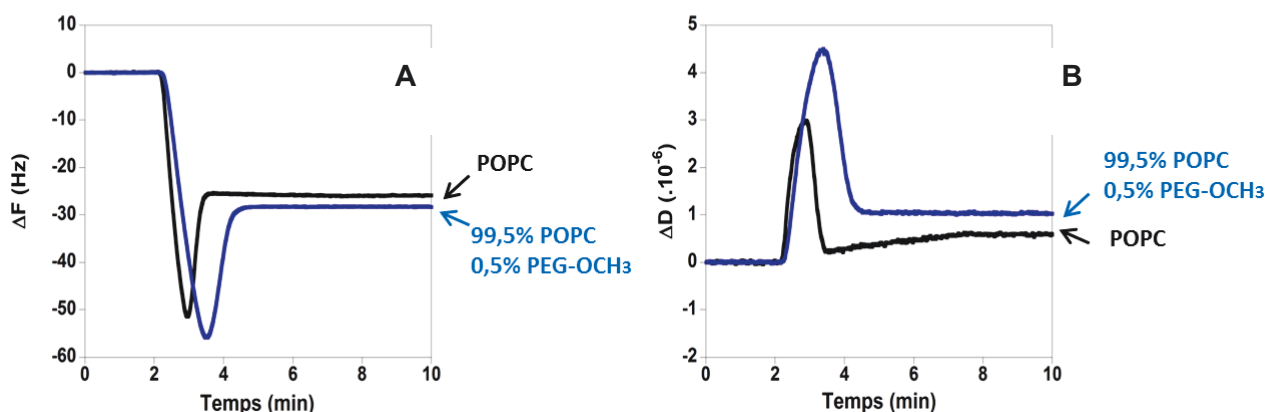


Figure 85 : Formation de bicouches lipidiques supportées (SLB) ou espacées (tBLM) suivie par QCM-D. A) Variation de fréquence en fonction du temps. B) Variation de la dissipation en fonction du temps. En noir, solution de liposomes composés exclusivement de POPC. En bleu, solution de liposomes 99,5% PEG-OCH₃/0,5% POPC

L'ajout de suspensions de liposomes composés de 0,5% de PEG-OCH₃ et 99,5% de POPC ou de 100% de POPC (Figure 85 A), montre une première phase durant laquelle la fréquence de résonance décroît rapidement. Cette décroissance de la fréquence de résonance est corrélée à une augmentation de la dissipation (Figure 85 B) pouvant être reliée à la nature viscoélastique des liposomes. Après avoir atteint un seuil critique, nous observons une phase pendant laquelle la variation de fréquence augmente fortement et la

variation de dissipation diminue fortement jusqu'à une valeur qui ne varie pas après plusieurs lavages. Un état d'équilibre est donc atteint. Ce comportement est bien connu et il s'explique de la manière suivante¹⁰ : dans un premier temps, les liposomes s'adsorbent sur la surface de SiO₂. Lorsque l'adsorption de liposomes atteint un seuil critique, les liposomes vont se rompre et relarguer la solution tampon qu'ils renfermaient.

La différence notable concerne la valeur finale de fréquence de résonance à l'état d'équilibre. Dans le cas des liposomes composés de POPC, la valeur de variation de fréquence Δf est de $-25 \text{ Hz} \pm 1 \text{ Hz}$ et celle de la dissipation ΔD est de $0,3 \cdot 10^{-6}$ indiquant la formation d'une bicouche lipidique tandis que dans le cas des liposomes mixtes (0,5% de PEG-OCH₃ et 99,5% de POPC), ces valeurs (ΔF de $-29 \text{ Hz} \pm 1 \text{ Hz}$ et ΔD de $1,1 \cdot 10^{-6}$) sont légèrement plus élevées. La différence de fréquence de résonance suggère qu'une masse plus importante est ajoutée sur la surface de SiO₂. Ce résultat est en accord avec les travaux de Kaufmann² pour lesquels il a été établi qu'une bicouche lipidique espacée était formée. Les hypothèses que nous pouvons formuler à propos de cette différence de fréquence de résonance est qu'elle est due soit à la présence de PEG dans la SLB, la rendant plus lourde, soit à une hydratation plus importante de la surface (entre la bicouche lipidique et le support), voire les deux.

Dans le but de confirmer la présence d'une bicouche lipidique, la technique de FRAP a été utilisée. Cette technique permet de déterminer la mobilité des molécules lipidiques. Pour cela, des liposomes composés de 0,5% de PEG-OCH₃ et 98,5% de POPC auxquels sont ajoutés 1 % de NBD-PC, molécules lipidiques fluorescentes, ont été incubés pendant 30 minutes sur la surface puis rincés avant d'effectuer les mesures de FRAP.

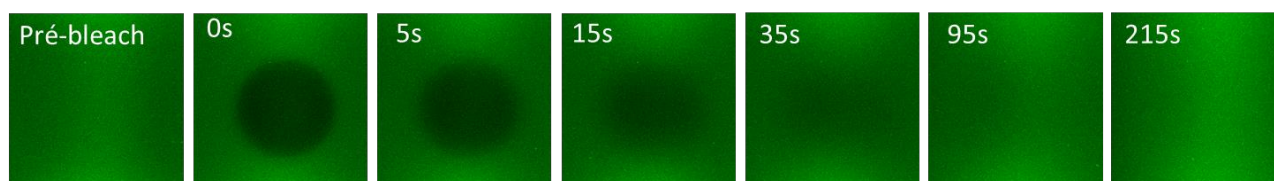


Figure 86 Images obtenues avec la technique de FRAP sur des suspensions de liposomes de composition 0,5% PEG-OCH₃ / 98,5% POPC / 1% NBD-PC incubées 30 minutes sur une surface de verre hydrophile. Des suspensions de liposomes ont été incubées 30 minutes sur la surface de verre rendue hydrophile par traitement oxydatif (plasma O₂ Diener (95%, 5 minutes, 1,5 mBar)). La surface a ensuite été rincée à deux reprises avec une solution tampon de PBS. Une zone de 40 μm a ensuite été photo-blanchie à l'aide d'un faisceau laser de puissance 15 mW à une longueur d'onde de 488 nm. Des images ont été prises avant le photo-blanchiment (pré-bleach), juste après (t=0s) puis à 5s, 35s, 95s et 215s. 6 expériences ont été réalisées sur différentes zones et différentes surfaces de verre incubées.

Le photo-blanchiment (à $t = 0 \text{ s}$) d'une région (Figure 86), provoque l'apparition d'une zone noire indiquant que la fluorescence de cette région a été détruite sous l'effet d'une importante intensité lumineuse appliquée sur la surface. Les dommages causés aux

molécules lipidiques fluorescentes contenues dans cette zone sont irréversibles. L'image prise après 5 secondes montre la zone photo-blanchie avec des contours d'apparence floue. Après 35 secondes, la zone photo-blanchie n'est quasiment plus visible. Les images obtenues après 95 secondes et 215 secondes sont similaires à celle capturée avant le photo-blanchiment de la zone. Après 395 secondes toute la zone est à nouveau fluorescente indiquant une mobilité des molécules lipidiques. La fraction mobile mesurée de $80 \pm 9\%$ corrobore l'observation de la mobilité des molécules lipidiques fluorescentes. Le coefficient de diffusion calculé de $1,8 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ confirme que les molécules lipidiques diffusent. Ce résultat est en accord avec la formation d'une bicouche lipidique fluide¹¹.

En outre, le coefficient de diffusion obtenu pour ces suspensions de liposomes ($1,8 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) est plus élevé que celui calculé pour des suspensions de liposomes de composition 100% de POPC ($1,4 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (*cf. chapitre 1*). Ceci indique que les molécules lipidiques de POPC contenues dans la bicouche lipidique de composition 99,5% POPC / 0,5% PEG-OCH₃ diffusent plus rapidement et sont donc plus mobiles. Ces résultats obtenus sont cohérents avec ceux reportés de Reimhult et coll.², montrant que la mobilité plus importante des molécules lipidiques de POPC dans la bicouche lipidique de composition 0,5% POPC / 99,5% PEG-OCH₃ résulte d'une moindre interaction entre la surface de SiO₂ et la bicouche lipidique. Ceci indique que les molécules de POPC sont plus éloignées de la surface suggérant la formation d'une bicouche lipidique espacée et ancrée².

1.1.2. Incorporation de protéines membranaires dans les tBLMs

Ayant produit la bicouche lipidique ancrée et espacée (tBLM), nous avons ensuite étudié la production et l'incorporation de la protéine membranaire AqpZ produite par le système d'expression protéique acellulaire (CFPS) incubé sur ces tBLMs. Nous avons cherché à savoir si la production et l'insertion des protéines membranaires était différente entre les deux types de bicouches lipidiques (SLB et tBLM) que nous avons mis au point.

Dans ce but, les solutions de CFPS contenant ou non un plasmide d'ADN portant le gène codant pour l'AqpZ sont ajoutées sur ces tBLMs (0,5% de PEG-OCH₃ et 99,5% de POPC) ainsi que sur des SLBs composées exclusivement de POPC.

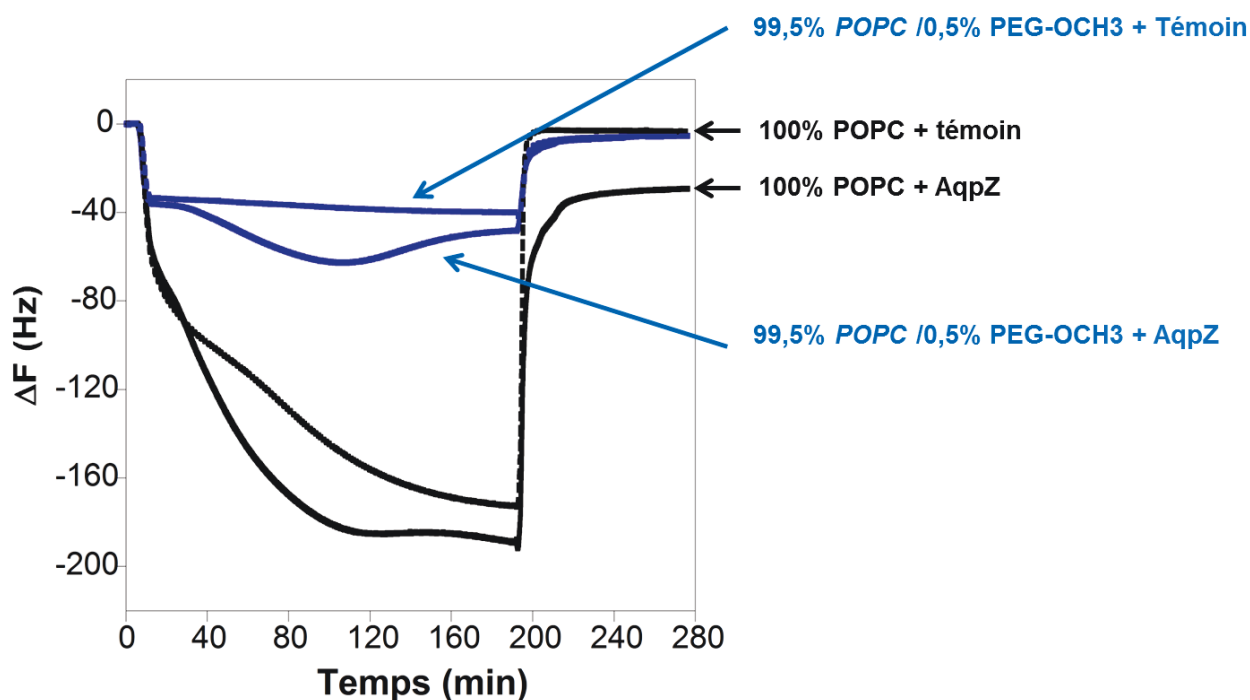


Figure 87 : Mesures de l'incorporation de l'Aquaporine Z et d'un contrôle (sans plasmide ajouté dans le CFPS) par QCM-D sur tBLM formées sur SiO₂ à partir de solutions de liposomes de ratio molaire : 99,5 mol% POPC/0,5 mol% PEG-OCH₃. Après la formation des SLBs et des tBLMs, la température des chambres est ajustée à 30°C et un nouvel enregistrement est amorcé. 180 µL de solution de CFPS comportant ou non le plasmide portant le gène codant pour l'AqpZ sont incubés durant 3 heures avant rinçage par du tampon PBS, pH 7,4.

Après l'injection des solutions de CFPS dans les chambres de QCM-D, une variation de fréquence de résonance d'une valeur de l'ordre de -40 Hz à -60 Hz est observée pour toutes les conditions (Figure 87). Cette variation de fréquence de résonance est due à l'adsorption des différents constituants du CFPS sur la bicouche lipidique supportée ou espacée. Des comportements différents selon les conditions testées sont ensuite observés. Concernant la solution de CFPS dite témoin (sans plasmide portant le gène de l'AqpZ) ajoutée sur la SLB de composition 100% de POPC, la fréquence de résonance diminue fortement jusqu'à -170 Hz après 3 heures d'incubation. En revanche, si la même solution de CFPS est ajoutée sur une tBLM de composition 0,5% PEG-OCH₃ / 99,5% POPC aucune modification de la fréquence de résonance n'est visible. Un lavage avec la solution tampon (PBS), connu pour permettre l'élimination du matériel non adsorbé sur la surface, est ensuite opéré. Ce lavage induit dans les deux cas, une augmentation rapide de la fréquence de résonance jusqu'à atteindre la valeur de début de l'expérience (0 Hz). Ceci indique que le matériel de CFPS ajouté sur la surface d'une SLB ou d'une tBLM est éliminé.

Lors de l'ajout d'une solution de CFPS contenant le plasmide portant le gène codant pour l'AqpZ sur la SLB, la fréquence de résonance diminue fortement jusqu'à une valeur de -190 Hz après 3 heures d'incubation. Après le lavage opéré, la fréquence de résonance remonte

rapidement et fortement jusqu'à atteindre -30 Hz. Ceci suggère que la protéine AqpZ est produite. En revanche, si la même solution est ajoutée sur la tBLM, une faible diminution de la fréquence de résonance est observée pendant les deux premières heures d'incubation. Il s'ensuit une légère remontée de la fréquence de résonance. Après 3 heures d'incubation, la valeur de fréquence de résonance relevée est de -50 Hz. Ceci suggère que l'expression protéique a été inhibée ou qu'elle est très faible. Après le lavage, la fréquence de résonance remonte fortement et rapidement jusqu'à une valeur de 0 Hz indiquant que tout le matériel de CFPS a été éliminé.

1.1.3. Conclusion

Une tBLM a pu être formée sur SiO_2 en utilisant l'espaceur PEG- OCH_3 avec un ratio molaire de 0,5% de PEG- OCH_3 et 99,5% de POPC. Lors de l'incubation de CFPS (comportant ou non le plasmide contenant le gène codant pour l'AqpZ) sur une bicouche lipidique supportée composée de 100% de POPC, une production de protéines a été mise en évidence. En revanche, l'incubation des mêmes solutions de CFPS sur une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM) a révélé qu'aucune protéine n'est retenue après le lavage de la surface. Ce résultat nous interroge sur les raisons de cet échec du système d'expression protéique acellulaire incubé sur tBLM. Deux hypothèses ont été émises : la première est qu'il n'y a pas de production de protéines. Cette hypothèse est peu probable puisqu'en comparant les résultats obtenus au cours de l'incubation pour le témoin et la protéine, une faible différence de fréquence de résonance est observée suggérant une faible production protéique. La deuxième hypothèse formulée suggère que la production de protéines a été inhibée. Cette inhibition pourrait être due à la présence de polyéthylène glycol (PEG)? Celui-ci pourrait avoir une action répulsive sur l'expression protéique malgré la configuration « mushroom » que nous avons privilégiée, ou alors les extrémités $-\text{OCH}_3$ de cette molécule de PEG aurait un effet inhibiteur sur le système CFPS ou encore que la production a lieu mais que la protéine n'est pas retenue parce que la tBLM n'est pas très stable du fait de la non formation d'une liaison covalente entre le groupement méthoxy ($-\text{OCH}_3$) de la molécule de PEG et la surface d'or.

1.2. Formation d'une tBLM avec un espaceur PEG-NH₂

1.2.1. Formation de la tBLM

Afin d'expliquer les difficultés rencontrées lors de l'incorporation de protéines dans une tBLM de composition 0,5% PEG-OCH₃ et 99,5% de POPC, plusieurs hypothèses ont été émises. L'une des hypothèses est que la non incorporation de protéine pourrait provenir de l'extrémité -OCH₃ du PEG ou du PEG lui-même, c'est pourquoi nous avons choisi de remplacer le groupement -OCH₃ par un groupement -NH₂. Cette nouvelle molécule est le PEG-NH₂, qui comporte une partie lipidique, un PEG et une extrémité -NH₂ (cf. *Partie II : matériel et méthodes*). Les liposomes sont composés de POPC et de PEG-NH₂ dans le même ratio molaire que celui utilisé pour les expériences avec le PEG-OCH₃ (0,5% de PEG-NH₂ et 99,5% de POPC). Ces liposomes sont ajoutés sur des surfaces de SiO₂ rendues hydrophiles à l'aide d'un procédé oxydatif utilisant un plasma à oxygène.

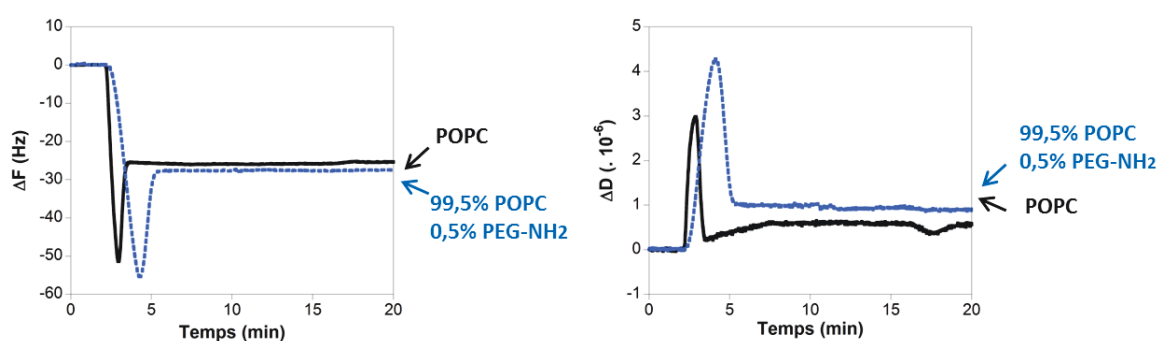


Figure 88 : Formation de bicouches lipidiques supportées (SLB) ou espacées (tBLM) sur SiO₂ suivie par QCM-D. A) Variation de fréquence en fonction du temps. B) Variation de la dissipation en fonction du temps. En noir, solution de liposomes composés exclusivement de POPC. En bleu, solution de liposomes 99,5% PEG-NH₂/0,5% POPC.

L'ajout de suspensions de liposomes de ratio molaire 0,5% PEG-NH₂ / 99,5% POPC ou 100% POPC sur SiO₂ hydrophile (Figure 88), induit une diminution de la fréquence de résonance et une augmentation de la dissipation correspondant à l'adsorption de liposomes sur la surface de SiO₂. Ensuite, les fréquences de résonance augmentent et la dissipation diminue jusqu'à atteindre une valeur qui ne varie plus même après lavage. Ce qui signifie qu'à partir d'un seuil critique correspondant à une saturation en liposomes recouvrant la surface, les liposomes se rompent et relarguent la solution tampon qu'ils renfermaient. Le comportement de ces deux différentes suspensions de liposomes est donc semblable sauf concernant les valeurs de fréquence de résonance obtenues après la phase de lavage (-27 Hz pour 0,5% PEG-NH₂ / 99,5% POPC vs -25 Hz pour 100% POPC). Le même résultat avait été obtenu pour les expériences menées avec l'espaceur PEG-OCH₃.

Pour confirmer qu'une bicouche lipidique est formée sur la surface de SiO_2 à partir d'une suspension de liposomes de composition 0,5% de PEG-NH₂ et 98,5% de POPC, des mesures de recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP) ont été effectuées sur surface de verre.

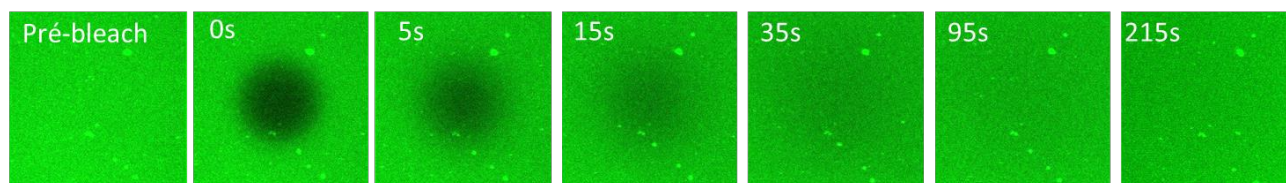


Figure 89 : Images avant et après photoblanchiment d'une zone de 40 μm de diamètre comportant des molécules lipidiques de composition 0,5% POPC / 99,5% PEG-NH₂. Un traitement oxydatif de la surface de verre est effectué avec un plasma O₂ pour la rendre hydrophile. Des suspensions de liposomes sont ensuite ajoutées sur la surface. Un lavage avec du tampon de solution PBS, pH 7,4 est opéré. Le photoblanchiment est effectué avec un laser de puissance 15 mW à une longueur d'onde de 488 nm. Après le photoblanchiment un recouvrement partiel de la fluorescence est observé. Pour plus de détails techniques, se référer à la partie II : matériel et méthodes.

Après le photo-blanchiment d'une zone comportant les liposomes de composition 0,5% POPC-PEG-NH₂ / 98,5% POPC auxquels ont été ajoutés 1% de NBD-PC, l'apparition d'une zone noire est visible (Figure 89). Après 5 secondes suivant ce photo-blanchiment, la zone noire est toujours visible mais son diamètre est plus faible. Entre 5 secondes et 35 secondes, la diminution de la zone photo-blanchie est perceptible. Après 95 secondes, la réapparition totale de la fluorescence est observée. La fraction mobile mesurée de $98 \pm 1\%$ conforte cette observation et le coefficient de diffusion calculé de $1,2 \pm 0,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ confirme la mobilité des molécules fluorescentes. Ceci indique la formation d'une bicouche lipidique fluide et confirme les résultats obtenus avec la technique de QCM-D.

1.2.2. Incorporation de protéines

Après avoir formé des bicouches lipidiques supportée (SLB) composées de 100% de POPC et des bicouches lipidiques espacées et ancrées (tBLM) de composition 99,5% POPC et 0,5% PEG-NH₂, une solution du système protéique acellulaire (CFPS) ne contenant pas le plasmide portant le gène de l'AqpZ servant de contrôle et une solution de CFPS comportant le plasmide portant le gène codant pour l'Aquaporine Z sont injectées dans les chambres de QCM-D. Les variations de fréquences de résonance sont mesurées pendant 4 heures comprenant une période de 3 heures d'incubation des solutions de CFPS (Figure 90).

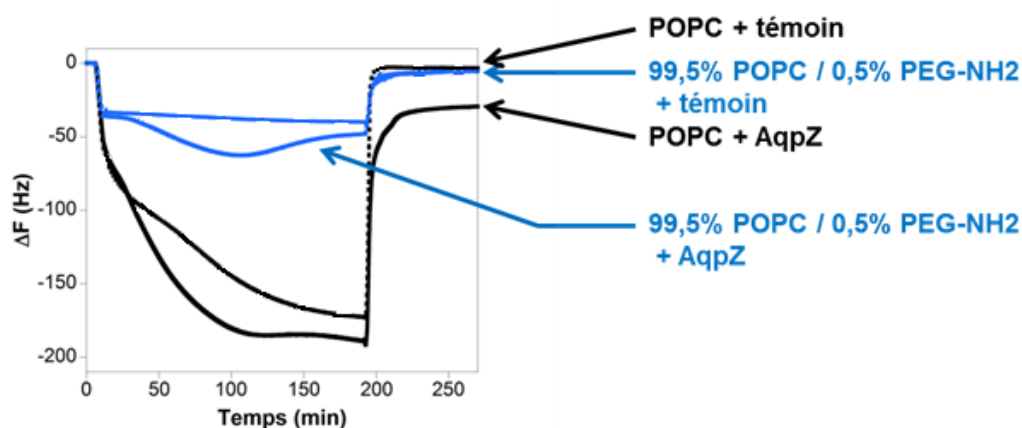


Figure 90 : Mesures de l'incorporation de l'Aquaporine Z et d'un contrôle (sans plasmide ajouté dans le CFPS) par QCM-D sur tBLM formées à partir de solutions de liposomes de ratio molaire : 99,5 mol% POPC/0,5 mol% PEG-NH₂. Les protéines sont incubées durant 3 heures à 30°C avant rinçage par du tampon de solution.

Une diminution de la fréquence de résonance (de -30 Hz à -60 Hz) est observée après l'injection des solutions de CFPS induisant ou non la production de protéines sur les bicouche lipidique composées de 100% de POPC ou de 0,5% de PEG-NH₂ / 99,5% de POPC. Cette variation de fréquence est due à l'adsorption des différents constituants du CFPS sur la bicouche lipidique. L'ajout d'une solution CFPS servant de contrôle sur la bicouche lipidique supportée (SLB) induit une diminution forte de la fréquence de résonance jusqu'à atteindre une valeur de -170 Hz après 3 heures d'incubation. La même solution de CFPS ajoutée sur la tBLM montre que la variation de fréquence de résonance ne subit pas de modifications et reste faible (-35 Hz). La phase de lavage opérée sur ces deux conditions a pour conséquence une augmentation rapide de la fréquence de résonance jusqu'à une valeur de -0 Hz indiquant que le matériel de CFPS ajouté sur la surface a été éliminé.

Lors de l'ajout d'une solution de CFPS contenant le plasmide portant le gène codant pour l'AqpZ sur une bicouche lipidique supportée une diminution de la fréquence de résonance est observée. Après 3 heures d'incubation de la solution de CFPS, une valeur de fréquence de résonance de -190 Hz est relevée. Lors du lavage, la fréquence de résonance augmente rapidement jusqu'à atteindre une valeur stabilisée de -35 Hz. Ceci indique que la protéine AqpZ est produite mais également que du matériel biologique est adsorbé sur la surface de la SLB. Les signaux mesurés lors de l'ajout de la même solution de CFPS sur une tBLM sont différents. En effet, après l'ajout de cette solution, la fréquence de résonance diminue très légèrement pendant 2 heures avant de remonter faiblement. Après la phase de lavage, une remontée rapide de la fréquence de résonance est observée jusqu'à une valeur de 0 Hz. Ce résultat indique une absence de production ou une faible production de l'AqpZ. Ceci

confirme que le polymère de polyéthylène glycol (PEG) a une action inhibitrice sur la production de protéines par le CFPS.

1.2.3. Formation de la tBLM sur surface fonctionnalisée et incorporation de protéines membranaires

Nous avons montré la possibilité de former une tBLM sur surface de SiO₂ que ce soit à partir de suspensions de liposomes composées de 0,5% PEG-OCH₃ / 99,5% POPC ou 0,5% PEG-NH₂ / 99,5% POPC. Lors de l'incubation des solutions de CFPS contenant le plasmide portant le gène codant pour l'AqpZ sur ces bicouches lipidiques nous n'avons constaté aucune incorporation de protéines parce que la production de celle-ci est très faible voire inexistante. L'une des hypothèses formulée pour expliquer ce résultat est que l'absence de liaison covalente entre la surface et le polymère de polyéthylène glycol fait que ces PEG sont peu liés à la surface de SiO₂ et sont donc plus présents à la surface de la bicouche lipidique. La présence importante de PEG en surface aurait potentiellement un effet répulsif sur les solutions de CFPS ajoutées sur la bicouche lipidique. Pour contourner ce problème, nous avons choisi de modifier la surface de SiO₂ afin de former une tBLM ancrée par une liaison covalente à la surface. Pour ce faire, la surface de SiO₂ est fonctionnalisée par un procédé de silanisation avec 1% d'une solution de glycidoxypropyl-trimethoxy-silane (GPTS), méthode communément utilisée pour préparer des surfaces silanisées utilisant des fonctions époxydes. Pour cette silanisation des surfaces de SiO₂, nous avons utilisé deux méthodes: l'une utilisant le GPTS dilué à 1% dans une solution d'éthanol, l'autre utilisant le GPTS dilué à 1% dans une solution de toluène selon le protocole décrit *partie II : matériel et méthodes*.

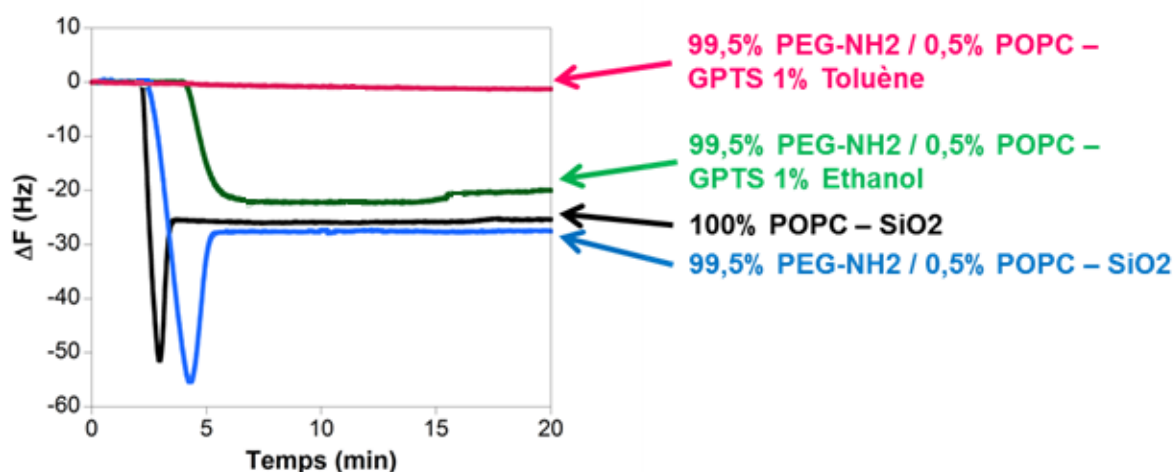


Figure 91 : Formation de bicouches lipidiques supportées (SLB) ou espacées (tBLM) suivie par QCM-D. En noir, solution de liposomes composés exclusivement de POPC sur une surface de SiO₂. En bleu, solution de liposomes 99,5% PEG-NH₂ / 0,5% POPC sur une surface de SiO₂. En vert, solution de liposomes 99,5% PEG-NH₂ / 0,5% POPC sur une surface de SiO₂ fonctionnalisée avec une solution de GPTS 1% diluée dans de l'éthanol 99%. En rose, solution de liposomes 99,5% PEG-NH₂ / 0,5% POPC sur une surface de SiO₂ fonctionnalisée avec une solution de GPTS 1% diluée dans du toluène.

La Figure 91 présente la formation de bicouches lipidiques ou espacées. Une première condition correspondant à l'ajout d'une suspension de liposomes composée de 100% de POPC sur une surface SiO₂ hydrophile (*noir*) montre que suite à l'ajout de la suspension de liposomes la fréquence de résonance diminue fortement avant d'augmenter rapidement jusqu'à une valeur de -25 Hz. Ce comportement est caractéristique de la formation d'une bicouche lipidique supportée (SLB) telle que nous l'avons décrit dans le chapitre 1.

La seconde condition montre l'ajout d'une suspension de liposomes composée de 0,5% PEG-NH₂ / 99,5% POPC sur une surface SiO₂ hydrophile (*bleu*). Le même comportement que celui décrit pour la première condition est observé. Les deux autres conditions présentent l'ajout d'une suspension de liposomes composée de 0,5% PEG-NH₂ / 99,5% POPC sur une surface SiO₂ fonctionnalisée avec une solution de GPTS diluée dans de l'éthanol 99% (*vert*) ou diluée dans du toluène (*rose*). Dans le cas d'une surface fonctionnalisée avec une solution de GPTS diluée dans de l'éthanol 99%, une diminution de la fréquence de résonance est observée jusqu'à une valeur de -23 Hz qui ne varie plus après une phase de lavage. Ceci indique qu'une adsorption de matériel est observée. Seule une suspension de liposomes de composition 0,5% PEG-NH₂ / 99,5% POPC ayant été ajoutée sur la surface silanisée, ce matériel adsorbé ne peut être que des liposomes. Il se pose alors la question de la formation d'une bicouche lipidique sur la surface de SiO₂ silanisée. La valeur de -23 Hz, proche de la fréquence de résonance de -25 Hz caractéristique de la formation d'une SLB suggère la formation d'une bicouche lipidique supportée. Dans la littérature il est

rapporté que des liposomes chargés positivement sur une surface de SiO_2 ¹² fusionnent directement sur la surface sans nécessiter l'atteinte d'un seuil critique pour former une SLB. Ceci pourrait conforter l'idée d'une bicouche lipidique supportée formée sur cette surface de SiO_2 fonctionnalisée. L'ajout de la même solution de liposomes sur une surface fonctionnalisée avec du GPTS 1% dilué dans du toluène (rose) ne montre aucune modification de la fréquence de résonance indiquant qu'aucun élément n'est adsorbé.

Nous avons ensuite ajouté sur ces différentes bicouches lipidiques formées, des solutions de CFPS contenant le plasmide portant le gène codant pour l'AqpZ à l'exception de la surface de SiO_2 fonctionnalisée avec du GPTS 1% dilué dans le toluène où aucune adsorption n'a été observée lors de l'ajout de suspensions de liposomes.

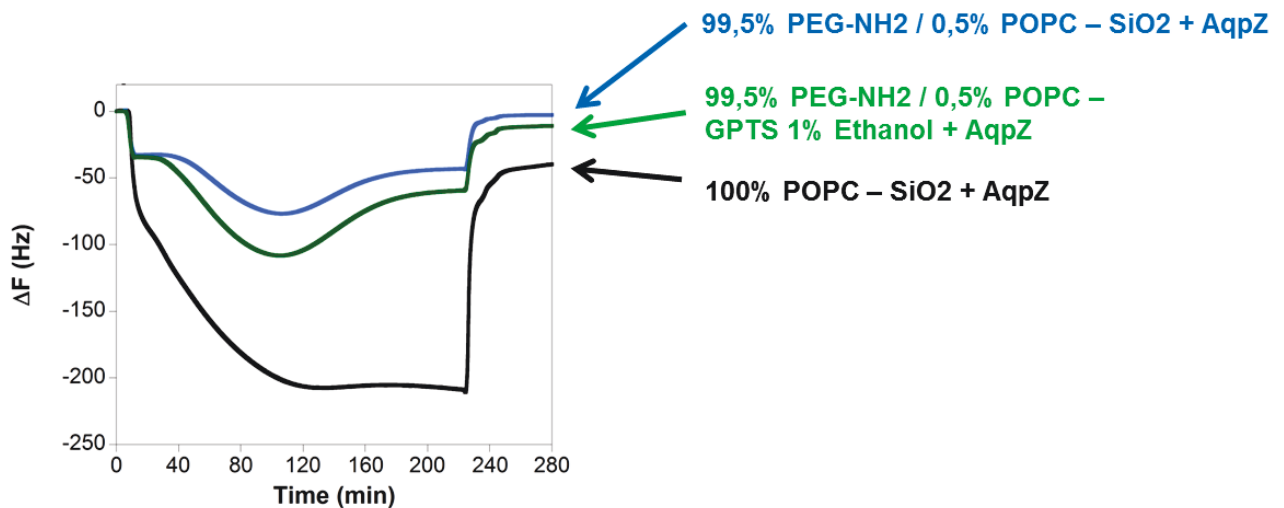


Figure 92 : Mesures de l'incorporation de l'Aquaporine Z par QCM-D sur différentes bicouches lipidiques SLB ou tBLM formées sur des surfaces de SiO_2 . Les protéines sont incubées durant 3 heures à 30°C avant ringage par du tampon de solution. En noir, CFPS sur une bicouche lipidique composée exclusivement de POPC sur une surface de SiO_2 . En bleu, CFPS sur une bicouche lipidique composée de 99,5% PEG-NH₂ / 0,5% POPC sur une surface de SiO_2 . En vert, CFPS sur une bicouche lipidique composée de 99,5% PEG-NH₂ / 0,5% POPC sur une surface de SiO_2 fonctionnalisée avec une solution de GPTS 1% diluée dans de l'éthanol 99%.

Dans cette Figure 92, nous observons après l'injection des solutions de CFPS, une diminution brutale des fréquences de résonance ce qui s'explique logiquement par l'adsorption des différents constituants du CFPS sur la bicouche lipidique. Cette diminution de la fréquence de résonance continue rapidement sur les bicouches lipidiques supportées composées exclusivement de molécules lipidiques de POPC jusqu'à une valeur de -190 Hz après 3 heures d'incubation. Après la phase de lavage, la fréquence de résonance remonte à la valeur voisine de -35 Hz. En revanche, pour les courbes obtenues sur les tBLMs formées sur une surface de SiO_2 et sur une surface fonctionnalisée, une faible diminution de la fréquence de résonance est observée suivie d'une légère remontée des signaux après 2 heures d'incubation. La valeur de fréquence de résonance obtenue après 3 heures d'expression protéique est de -70 Hz pour l'AqpZ sur SiO_2 et de -110 Hz sur la surface

fonctionnalisée. Ces résultats ne montrent aucune amélioration de la production des protéines membranaires AqpZ sur une tBLM formée sur une surface fonctionnalisée. Ces expériences non concluantes auxquelles se sont ajoutés des difficultés pour obtenir une fonctionnalisation de surface optimale font que le travail sur surface fonctionnalisée n'a pas été poursuivi.

1.3. Conclusion

Une tBLM a été mise au point sur SiO_2 ou surface de SiO_2 fonctionnalisée en utilisant des suspensions de liposomes de composition 0,5% de PEG-NH₂ et 99,5% de POPC. Lors de l'incubation d'une solution de CFPS comportant le plasmide portant le gène codant pour l'AqpZ, la production protéique est très faible ou inexistante. Pour expliquer ces résultats nous avons proposé que cela puisse être expliqué par l'absence de liaison covalente entre la surface et le polymère de polyéthylène glycol. Or, la fonctionnalisation de la surface n'améliore pas l'expression protéique. Une nouvelle hypothèse doit être formulée pour expliquer ce résultat. La tBLM formée n'est peut-être pas bien ancrée et espacée, ce qui aurait pour conséquence plus de molécules de polyéthylène glycol sur la partie supérieure de la bicouche lipidique. Cette présence plus importante de PEG pourrait inhiber le système d'expression protéique acellulaire mais également empêcher l'incorporation de protéines dans la bicouche lipidique.

2. Formation de tBLM sur or et incorporation d'AqpZ

Afin de comprendre pourquoi les protéines ne sont pas produites ou très faiblement produites par un système CFPS au contact des tBLMs formées sur surface de SiO₂ avec les molécules PEG-OCH₃ ou PEG-NH₂, nous avons décidé de changer de surface et également d'espaceur. La surface d'étude est désormais recouverte d'or alors que l'espaceur utilisé est similaire à celui utilisé sur SiO₂ à la différence que la molécule servant d'ancre est un disulfure protégé permettant une liaison covalente avec la surface d'or. Cet espaceur ancreur est le DSPE-PEG(2000)PDP (*cf. Partie II : matériel et méthodes*).

2.1. Adsorption des molécules DSPE-PEG(2000)PDP sur surface d'or

Afin de mettre au point une tBLM sur surface d'or, des suspensions de liposomes composées de molécules lipidiques de DSPE-PEG(2000) PDP et de POPC (ratio molaire de 0,5% / 99,5%) ont été ajoutées sur la surface d'or.

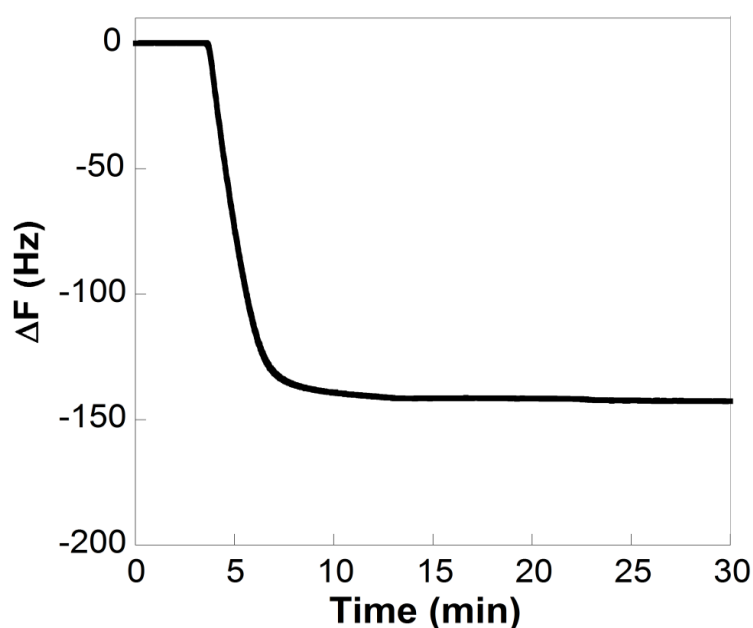


Figure 93 : Variation de la fréquence de résonance lors du dépôt de liposomes de composition 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP et 99,5% de POPC de concentration 0,1 mg/mL sur une surface d'or.

Comme le montre la Figure 93, l'injection d'une suspension de liposomes dans une chambre de QCM-D s'accompagne d'une diminution importante et rapide de la fréquence de résonance (Δf compris entre -130 Hz et -150 Hz) dont la valeur demeure inchangée après le lavage de la chambre avec le tampon. Cette valeur de fréquence de résonance est 5,6 fois supérieure à celle attendue lors de la formation d'une bicouche lipidique supportée (SLB). Elle est en accord avec les données de la littérature pour des suspensions de liposomes composées de molécules de POPC de concentration 0,1 mg/mL adsorbées sur une surface

d'or¹³. En conclusion, ce résultat s'explique par la présence d'une couche de liposomes adsorbés sur la surface.

Il nous faut donc trouver un moyen de faire fusionner les liposomes pour former une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM). D'après l'état de l'art (*cf. Partie I : état de l'art*), nous avons pu constater que des agents facilitant la fusion étaient parfois utilisés. Nous avons répertorié le polyéthylène glycol (PEG), le Triton X100 et plus récemment un alpha peptide. Le PEG étant déjà présent dans les suspensions de liposomes et dans le système CFPS, nous ne l'avons pas choisi. Le Triton X-100 est un détergent connu pour déstabiliser les membranes et permettre l'extraction de protéines membranaires, ce qui ne semble pas répondre à notre attente. Nous avons choisi l'alpha peptide du fait de sa capacité à faciliter la formation d'une bicouche phospholipidique supportée de POPC sur une surface d'or sans interférer avec la membrane lipidique formée¹⁴.

2.2. Utilisation d'une molécule facilitant la fusion lipidique : l'alpha peptide

2.2.1. Formation d'une SLB composée de 100% POPC sur or

D'après les données de la littérature, plusieurs paramètres sont à prendre en considération afin de faire fusionner des liposomes composés de POPC sur une surface d'or¹⁵. Il est nécessaire que la surface d'or ait un angle de contact inférieur à 35°¹⁵. Pour cela nous avons déterminé les paramètres d'utilisation d'un plasma à oxygène Tepla (200 W, 1000 mL/min, 5 minutes (*Cf. Annexe 1*)). Il est également nécessaire que les liposomes soient de petite taille (diamètre compris entre 55 et 70 nm¹⁵) pour que l'alpha peptide puisse agir. Le procédé d'obtention de formation des liposomes utilisé jusqu'à maintenant (sonication) ne peut donc plus être retenu. Nous avons donc utilisé le procédé d'extrusion car il permet d'obtenir des liposomes de taille plus petite et de mieux contrôler la distribution en taille de ceux-ci (*cf. Partie II : matériel et méthodes*). Pour cela, nous avons déterminé que 31 passages à travers des filtres de tailles respectives de 100 nm, 50 nm et 30 nm sont nécessaires pour obtenir la taille de liposomes voulue.

Les suspensions de liposomes ainsi obtenues sont ensuite injectées sur la surface d'or située dans la chambre de QCM-D (Figure 94).

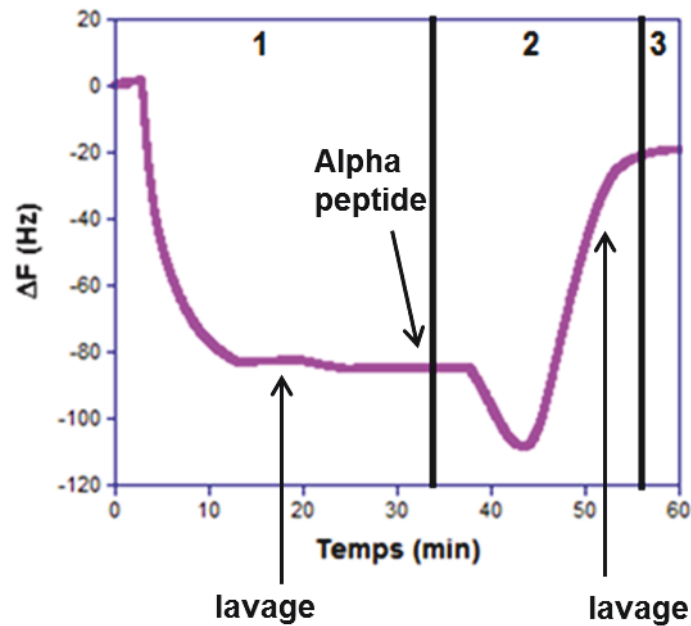


Figure 94 : Variation de la fréquence de résonance obtenue par QCM-D lors du dépôt de liposomes composés de molécules lipidiques de POPC sur une surface d'or hydrophile (1) suivi de l'action d'une solution d'alpha peptide (2) et d'une étape de lavage(3).

Cette injection est caractérisée par une diminution rapide de la fréquence de résonance pour atteindre une valeur minimale de -80 Hz qui reste stable même après 20 minutes de lavage par le tampon de réaction (PBS, pH 7,4). Ce résultat est en cohérence avec une formation d'une couche de liposomes intacts sur la surface d'or. Il est à noter que la valeur de fréquence de résonance obtenue après lavage est plus faible que celle décrite par Cho et coll¹⁵ (-130 Hz). La différence provient du choix du tampon utilisé. En effet, si la même expérience est réalisée avec le tampon Tris 10mM + NaCl 100mM recommandé par Cho et coll¹⁵, la même valeur de fréquence de résonance est retrouvée.

Après l'injection d'une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL dans la chambre de QCM-D (Figure 94 - phase 2), la fréquence de résonance diminue à -120 Hz du d'après les explications fournies par Cho et coll¹⁵, à la fixation de l'alpha peptide aux liposomes. Il s'ensuit une augmentation de la fréquence de résonance jusqu'à une valeur de -23 Hz qui peut être reliée à l'ouverture des liposomes induite par la présence de l'alpha peptide et en conséquence former une bicouche lipidique supportée. La valeur ainsi obtenue est proche de la valeur attendue de -25 Hz caractéristique en QCM-D d'une bicouche lipidique supportée (SLB).

2.2.2. Action de l'alpha peptide sur les liposomes de composition 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP /99,5% POPC

D'une part, nous avons précédemment montré que l'injection de liposomes composés de 0,5% de DSPE-PEG(2000) PDP et 99,5% de POPC sur surface d'or induit l'adsorption d'une monocouche de liposomes intacts. D'autre part, il a été montré que des liposomes composés de 100% de POPC fusionnent sur la surface d'or grâce à l'utilisation d'une solution d'alpha peptide. Dès lors, nous avons cherché à vérifier si l'ajout d'une solution d'alpha peptide sur les suspensions de liposomes composées de 0,5% de DSPE-PEG(2000) PDP et 99,5% de POPC déposées sur une surface d'or conduirait à la production de tBLM.

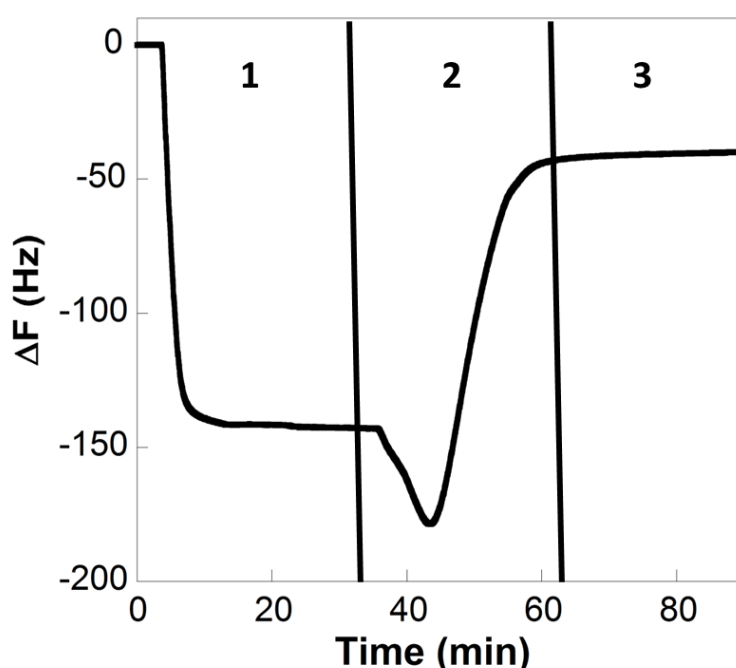


Figure 95 : Mesures obtenues en QCM-D suite à l'injection de suspension de liposomes de concentration 99,5 mol% POPC/0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP suivi de l'injection d'une solution d'alpha peptide. 1) Injection des suspensions de liposomes composés du ratio molaire 99,5 mol% POPC/0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP de concentration 0,1 mg/mL. 2) Injection d'une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL. 3) Rinçage avec du tampon de réaction.

Comme le montre la Figure 95, la variation de fréquence de résonance après l'ajout d'une suspension de liposomes de composition 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP et 99,5% POPC sur une surface d'or diminuent jusqu'à une valeur de -140 Hz qui reste inchangée après lavage de la surface. Ceci correspond, comme expliqué précédemment, à l'adsorption de liposomes sur la surface. Après l'injection d'une solution d'alpha-peptide de concentration 0,05 mg/mL, il est observé comme pour les liposomes de POPC, une phase durant laquelle la fréquence de résonance diminue du fait de la fixation de l'alpha-peptide sur les liposomes suivie d'une seconde phase dans laquelle la fréquence de résonance augmente rapidement

à une valeur de -45 Hz du fait de l'ouverture des liposomes relarguant la solution tampon de PBS qui était piégée à l'intérieur des liposomes. Après plusieurs lavages effectués après 20 minutes, cette valeur de fréquence de résonance reste stable. Elle est deux fois plus élevée que celle obtenue lors de la formation d'une SLB (-25 Hz). Cette différence pourrait s'expliquer soit par la présence d'un réservoir d'eau entre la bicouche lipidique et la surface d'or potentiellement plus important, soit à la présence du PEG qui augmenterait la masse.

Afin de confirmer l'action de l'alpha peptide sur les liposomes adsorbés sur surface d'or décrite dans l'analyse de QCM-D, nous avons effectué des expériences d'indentation AFM permettant d'observer ou non des événements de déformation plastique liés à la perforation de la bicouche. Ces expériences permettent de distinguer soit la présence de liposomes intacts sur la surface de mica recouverte d'un dépôt d'or, soit la formation d'une bicouche lipidique. Les histogrammes des événements de rupture/distance pour 0,5% / 99,5% sont reportés dans la Figure 96.

Deux forces différentes ont été appliquées (1,5 nN et 5 nN).

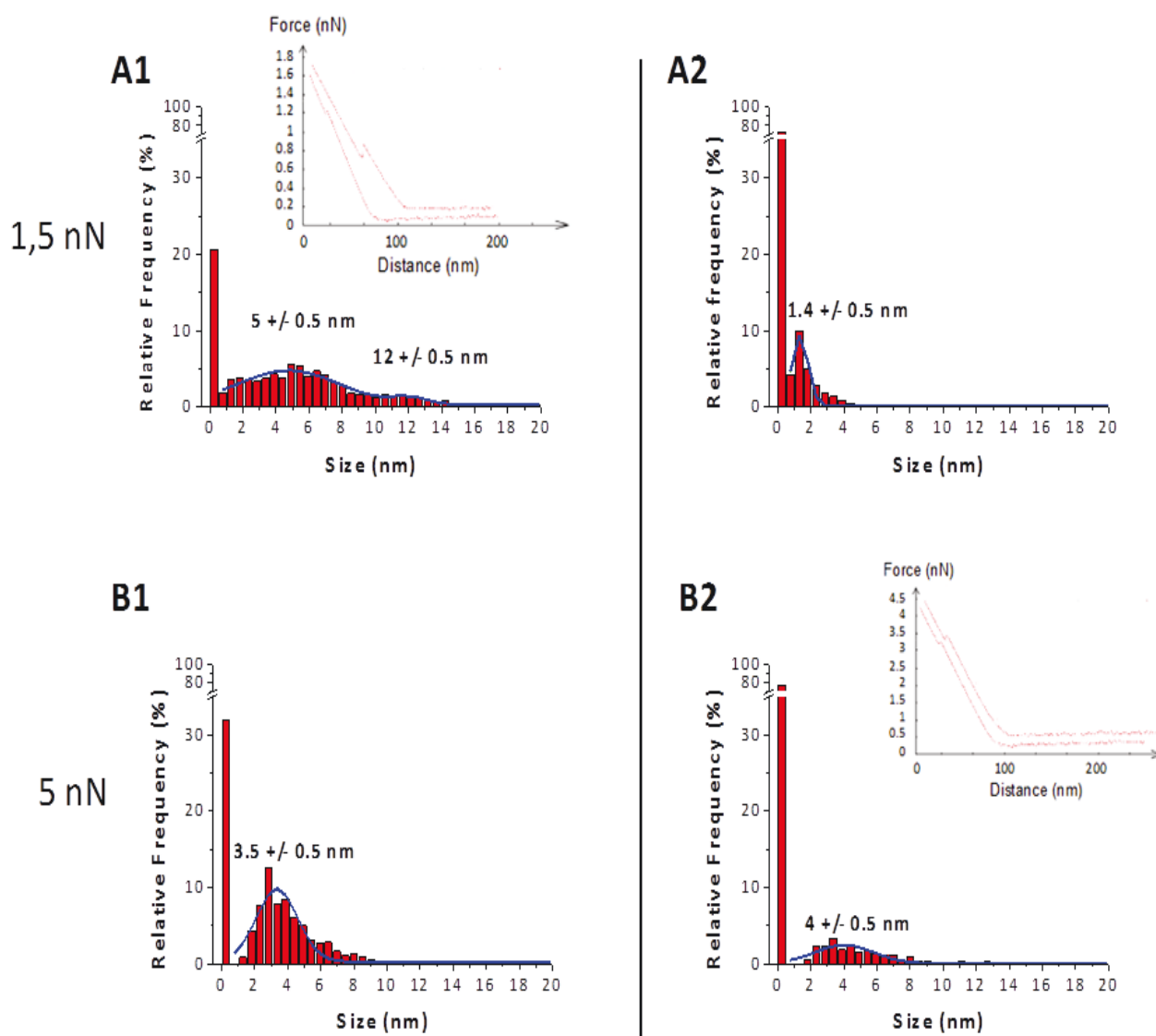


Figure 96 : Histogrammes rupture-distance ($n = 1024$ courbes) et courbes de forces typiques obtenues avec la technique de Microscopie à force atomique dans un environnement liquide sur des substrats recouverts d'or selon la méthode décrite dans la partie II : matériel et méthodes. Des suspensions de liposomes composées de 99,5% POPC / 0,5% DSPE-PEG-PDP ont été incubées 30 minutes. Le comportement de ces liposomes est observé avant l'ajout d'une solution d'alpha peptide (A1, B1) et après l'action d'une solution d'alpha peptide, incubée 1h et ensuite rincée avec du tampon (A2, B2). A1, A2 correspondent à une force appliquée maximale de 1.5 nN et B1, B2 à une force appliquée de 5 nN.

Après l'ajout d'une suspension de liposomes de composition 99,5% POPC et 0,5 DSPE-PEG(2000)PDP, les histogrammes de rupture / distance (Figure 96 A1) obtenus pour une consigne de force appliquée de 1,5 nN distinguent la présence de 2 populations ainsi que 20% de mesures sans évènement de déformation plastique (barre d'histogramme à 0 nm). La première population est centrée sur 12 nm et la seconde autour de 5 nm. Les données de la littérature¹⁶ nous apprennent que la déformation plastique obtenue pour une bicouche lipidique est comparable à l'épaisseur d'une bicouche (4-5 nm). Par conséquent,

cela suggère que la population centrée sur 12 nm correspond à des liposomes intacts qui recouvrent la surface d'or alors que la population centrée à 5 nm correspond à des bicouches lipidiques formées. Si les mêmes mesures sont effectuées avec une consigne de force appliquée plus importante (5 nN), une seule population est observée autour de 3,5 nm et la proportion de courbes analysées sans évènement d'impédance plastique est de 30% (Figure 96 B1). Cette valeur de 3,5 nm, du même ordre de grandeur de l'épaisseur connue d'une bicouche lipidique, corrélée à une seule population observée suggère que les liposomes ont fusionné sur la surface pour former une bicouche lipidique. Ces observations ont été confrontées aux données fournies par la littérature. Il s'avère que Wang et coll¹⁶ ont montré qu'une fusion de molécules lipidiques peut être induite par une force mécanique importante expliquant ainsi les résultats que nous avons obtenus.

Or, après l'action d'une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL, une seule catégorie d'évènements d'indentation plastique est observée. La rupture/ distance moyenne est située autour de 3 nm pour une force appliquée de 1,5 nN (Figure 96 A2) et de 4 nm pour une force appliquée de 5 nN (Figure 96 B2). Les histogrammes de rupture-distance montrent que dans ce cas 80% des mesures analysées ne révèlent aucun élément d'indentation à la surface et la moyenne des évènements de rupture distance est proche de l'épaisseur connue d'une bicouche lipidique. Ces résultats confirment que les liposomes se rompent pour former une bicouche lipidique recouvrant toute la surface d'or suite à l'action de l'alpha peptide. Ces résultats confirment que suite à l'ajout de suspensions de liposomes sur la surface d'or, des liposomes sont adsorbés intacts. En revanche, après l'ajout de la solution d'alpha peptide, une bicouche lipidique est obtenue.

En outre, nous n'avons aucunement montré que nous avons réellement formé une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM). Nous choisissons d'utiliser la technique de SPR, méthode optique non sensible à la masse de molécules d'eau ajoutées sur la surface¹⁷, afin de répondre à cette question. En effet, cette technique couplée à la QCM-D va nous permettre de connaître le contenu d'eau de cet assemblage moléculaire et donc potentiellement de déterminer la quantité d'eau présente entre la surface et la bicouche lipidique qui devrait être plus importante dans le cas d'une tBLM.

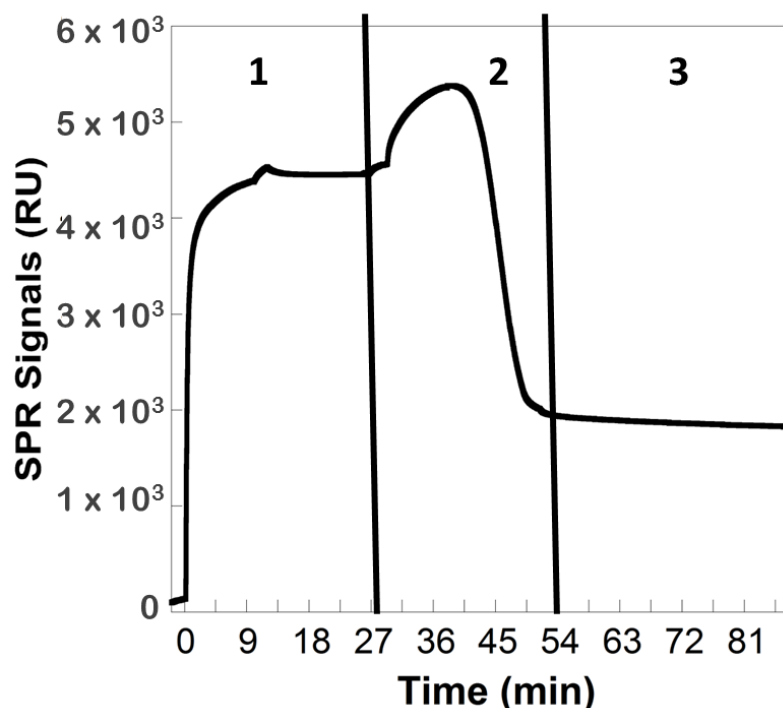


Figure 97 : Mesures obtenues en SPR suite à l'injection de suspension de liposomes de concentration 0,1 mg/mL sur une surface d'or. Le ratio molaire des liposomes utilisés est le suivant : 99,5 mol% POPC/0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP. Les signaux SPR sont exprimés en unités de réponse (RU).

La Figure 97 présente une première phase dans laquelle la valeur (RU) augmente du fait de l'adsorption de liposomes sur la surface. Lors de l'ajout de la solution d'alpha peptide (phase 2), la valeur mesurée augmente légèrement suggérant que l'alpha peptide se fixe ou s'accroche sur les liposomes. Enfin, une diminution rapide de la RU est observée qui atteint la valeur de $1,8 \cdot 10^3$, laquelle ne varie plus après lavage (étape 3). Cette dernière phase indique que l'alpha peptide a provoqué la rupture de liposomes qui relarguent la solution tampon incluse en leur cavité menant à la formation d'une bicouche lipidique.

Dans le but de vérifier que les bicouches lipidiques formées sont espacées et ancrées (tBLM), le taux d'hydratation doit être étudié. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus avec la QCM-D avec ceux de la SPR. En effet, la QCM-D permet de mesurer la quantité totale de matériel ajouté sur la surface y compris les molécules d'eau tandis que la SPR fournit des informations uniquement sur les molécules lipidiques ajoutées. La comparaison peut se faire à la condition de convertir les résultats obtenus en masse ajoutée sur la surface d'or. Les variations de fréquence de résonance mesurées en QCM-D sont combinés aux signaux de dissipation pour obtenir la densité de masse acoustique ajoutée sur la surface en utilisant le modèle de Voigt-Voinova¹⁸. La variation de réflectivité de surface, mesurée en RU est convertie en masse optique de surface en utilisant le facteur de proportionnalité de $1 \text{ RU} = 0,092 \pm 0,005 \text{ ng/cm}^2$ ¹⁹. La masse moyenne mesurée en QCM-D

est de $765 \pm 154 \text{ ng/cm}^2$ tandis que celle mesurée avec la SPR est de $152 \pm 33 \text{ ng/cm}^2$. La différence est donc d'environ 600 ng/cm^2 ce qui suggère qu'approximativement 80 à 90% de la masse ajoutée sur la surface d'or correspond aux molécules d'eau. Cette importante teneur en eau peut s'expliquer par l'espacement entre la surface et la bicouche lipidique. Ce résultat confirme donc la formation d'une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM) sur la surface d'or.

2.3. Incorporation de l'Aquaporine Z

Après la mise au point d'une tBLM sur surface d'or, nous avons étudié par la technique de QCM-D la production et l'incorporation de protéines membranaires produites par un système de CFPS incubé pendant 3 heures à une température de 30°C sur cette tBLM (Figure 98).

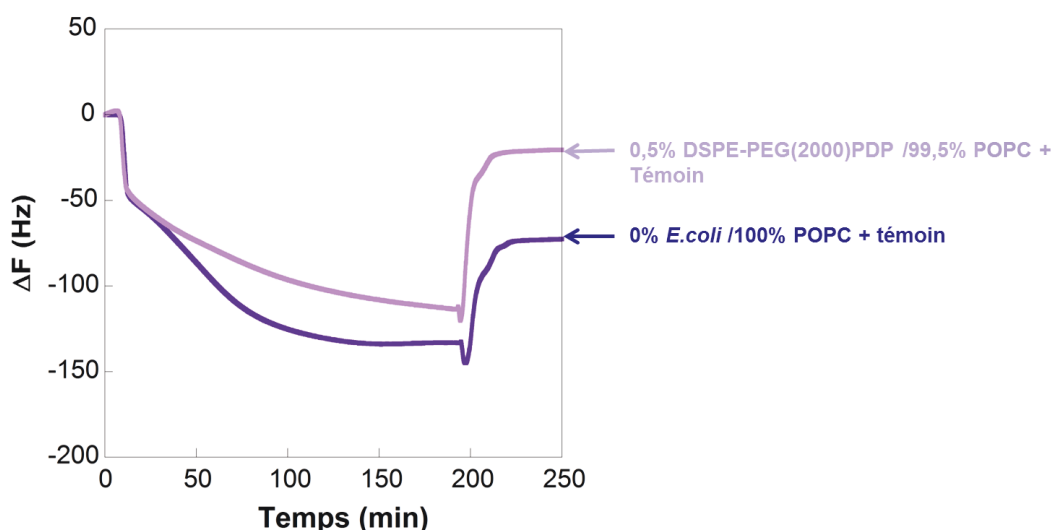


Figure 98 : Mesures de l'incorporation de l'Aquaporine Z et d'un contrôle (sans plasmide ajouté dans le CFPS) par QCM-D sur tBLM formées à partir de solutions de liposomes de ratio molaire 99,5 mol% POPC / 0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP. Après stabilisation des signaux, 180 μL d'une solution du système d'expression protéique acellulaire comportant le plasmide portant ou non le gène codant pour l'Aquaporine Z sont ajoutés. Les solutions d'expression protéique acellulaire sont ensuite laissées 3 heures sur la surface de la tBLM à une température de 30°C . Les chambres de QCM-D sont ensuite lavées avec du tampon PBS.

Une baisse de la fréquence de l'ordre de -40/-50 Hz est observée pour toutes les conditions environ 15 minutes après l'injection des solutions de CFPS « témoin » et « Aquaporine Z » dans les chambres de QCM-D. La variation de fréquence diminue ensuite rapidement à la fois pour l'AqpZ et le témoin. La variation de fréquence de résonance atteint au bout de 3h d'incubation, une valeur de -135 Hz pour l'AqpZ et une valeur de -110 Hz pour le témoin. Après lavage avec une solution tampon de PBS, les courbes montrent une augmentation rapide de la fréquence de résonance avant d'atteindre une valeur de -15/-20 Hz pour le témoin et de -70 Hz pour l'AqpZ. La valeur de fréquence de résonance obtenue pour le témoin suggère que tout le matériel provenant du système d'expression acellulaire

n'est pas éliminé à la différence des expériences précédemment menées sur SLB ou tBLM formées sur SiO₂. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que des éléments du système d'expression protéique acellulaire (CFPS) sont emprisonnés par les molécules de polyéthylène glycol exposées en surface.

La différence observée entre la courbe d'AqpZ et celle du témoin est de -55 Hz. Ceci correspond à la quantité d'AqpZ liée à la surface et suggère que la protéine AqpZ est produite par le système d'expression acellulaire.

Afin de vérifier que l'Aquaporine Z n'est pas que produite mais bien également incorporée dans cette tBLM, nous avons exprimé la variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence pour l'Aquaporine Z et pour le témoin (Figure 99) car cette représentation permet de définir les propriétés viscoélastiques du matériel ajouté sur la surface du quartz.

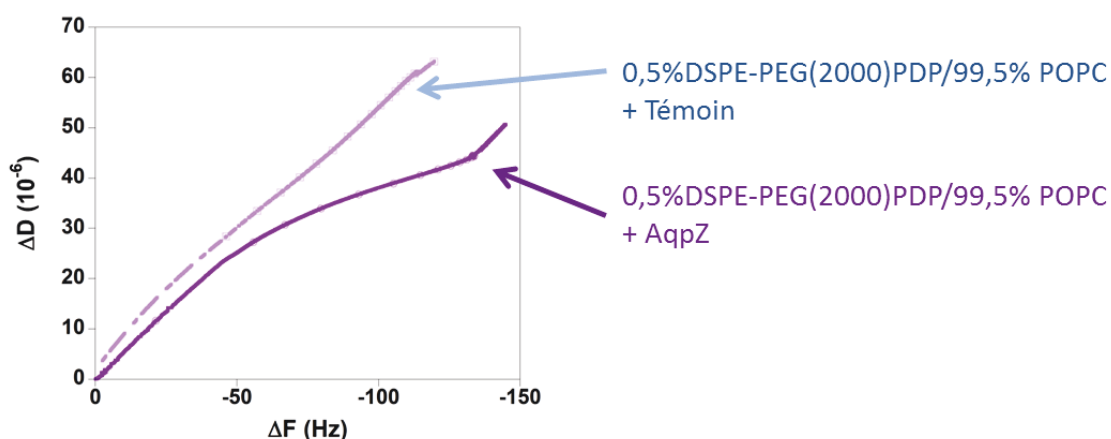


Figure 99 : Variation de la dissipation en fonction de la variation de fréquence obtenues pour l'Aquaporine Z et le témoin (sans plasmide ajouté dans le CFPS) par QCM-D sur tBLM formées à partir de solutions de liposomes de ratio molaire 99,5 mol% POPC / 0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP. Les mesures ont été effectuées avec le QCM-D. Les solutions d'expression protéique acellulaire sont laissées 3 heures sur la surface de la tBLM à une température de 30°C.

Dans le cas du témoin, une proportionnalité entre la dissipation et la fréquence de résonance est observée n'indiquant aucune modification de la viscoélasticité de la surface. En revanche dans le cas l'Aquaporine Z, une première phase est observée (de 0 à -50 Hz) dans laquelle la variation de dissipation augmente rapidement en rapport à la diminution de la fréquence. Ce comportement observé pour l'AqpZ indique une phase fortement viscoélastique. S'ensuit une seconde phase (de -50 Hz à -130 Hz) dans laquelle un ralentissement de l'augmentation de la dissipation est observé pour de grandes quantités de masses ajoutées correspondant à une rigidification de la surface. Enfin, une troisième phase peut être décrite (de -130 Hz à -150 Hz) pour laquelle la variation de dissipation augmente rapidement tandis que la fréquence de résonance diminue. Cette phase nous indique qu'outre une adsorption de molécules sur la surface de la tBLM celle-ci subit des

modifications de sa viscoélasticité. Ces observations sont interprétées comme la signature de l'incorporation d'Aquaporine Z au sein de la bicouche phospholipidique espacée et ancrée (tBLM) que nous avons formée sur surface d'or.

En conclusion, l'ajout d'une solution de CFPS contenant le gène codant pour l'AqpZ sur une tBLM de composition 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP et 99,5% de POPC sur surface d'or permet l'expression de protéines ainsi que leur incorporation. L'effet inhibiteur d'expression protéique et d'incorporation qui avait été observé lors de la formation de tBLMs sur une surface de SiO₂ n'est pas retrouvé suggérant que le polymère de polyéthylène glycol est dans une configuration appropriée (mushroom) ne nuisant pas à l'expression protéique. Ce résultat interroge quant au phénomène observé sur surface de SiO₂. Y avait-il réellement une tBLM formée sur la surface de SiO₂ ? La liaison covalente de la molécule de DSPE-PEG(2000)PDP avec la surface d'or jouent-elle un rôle quant à la stabilité de la tBLM formée ?

2.4. Optimisation du ratio molaire de la tBLM et incorporation d'AqpZ

2.4.1. Formation des tBLMs

Suite aux résultats obtenus montrant une incorporation d'Aquaporine Z, nous nous sommes interrogés sur l'impact du pourcentage de PEG sur l'incorporation des protéines membranaires. C'est pourquoi plusieurs ratios molaires de molécules espaceurs (DSPE-PEG(2000)PDP et de POPC (0,5% / 99,5% ; 2,5% / 97,5% ; 5% / 95%) ont été testées, tout en conservant la molécule servant d'espaceur en configuration « mushroom ».

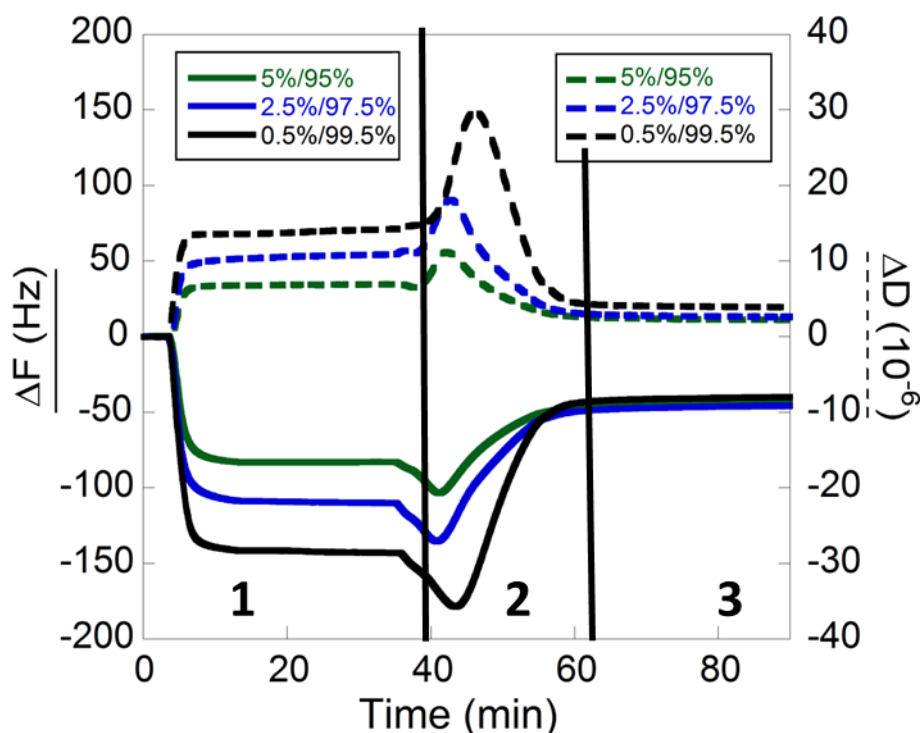


Figure 100 : Mesures obtenues en QCM-D suite à l'injection de suspension de liposomes de concentration 0,1 mg/mL sur une surface d'or avant et après ajout d'une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL. Les ratios molaires des liposomes utilisés sont les suivants : 95 mol% POPC/5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (vert), 97,5 mol% POPC/2,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (bleu), 99,5 mol% POPC/0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (noir). Les lignes pleines correspondent aux shifts de fréquence et les lignes pointillées correspondent aux valeurs de dissipation.

L'injection des trois suspensions de liposomes de compositions différentes (Figure 100) sur des surfaces d'or, dans les chambres de QCM-D dont la température a été ajustée à 25°C, s'accompagne d'une forte diminution des fréquences de résonance mesurée à l'aide de la QCM-D. Après 10 minutes, les fréquences de résonance ne varient plus. Le lavage effectué après 20 minutes avec du tampon PBS, pH 7,4 ne modifie pas les fréquences de résonance mesurées. Ceci indique qu'un état d'équilibre est atteint et que des liposomes sont adsorbés sur la surface. Ces données sont en accord avec ce qui a été rapporté précédemment. Toutefois, l'adsorption constatée pour les liposomes avec un ratio 95% / 5% est plus faible ($\Delta F = -80$ Hz) que pour celles de 97,5% / 2,5% (-100 Hz). Ceci indique que plus le ratio molaire en DSPE-PEG(2000)PDP composant les liposomes est important et plus la fréquence de résonance est faible. Cette observation pourrait s'expliquer par une fusion partielle des liposomes entre eux sur la surface due à la présence du DSPE-PEG(2000)PDP induisant localement la formation d'une tBLM comme décrite par Wang et coll²⁰.

Suite à l'ajout d'une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL, nous observons une première phase dans laquelle les fréquences de résonance diminuent du fait de la fixation de l'alpha peptide aux liposomes suivie d'une seconde phase dans laquelle les

fréquences de résonance augmentent rapidement avant d'atteindre une valeur stabilisée non modifiée après plusieurs rinçages (3). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Cho et coll pour la formation d'une SLB composée exclusivement de molécules lipidiques de POPC sur des surfaces d'or. L'effet de l'alpha peptide lors de son ajout est aussi clairement dépendant du ratio molaire composant les liposomes mais pas en ce qui concerne la fin de l'étape (3) pour laquelle les shifts de fréquences ne sont pas significativement différents (Tableau 8). Cette valeur est plus importante que celle caractérisée en QCM-D pour une bicouche lipidique supportée de l'ordre de -25 Hz. Nous avons précédemment vérifié que cette fréquence de résonance plus importante dans le cas d'une tBLM ($\Delta F = -45$ Hz) est due à la présence d'eau interstitielle entre la surface et la tBLM.

Nous avons ensuite caractérisé l'ajout de ces trois différentes suspensions de liposomes de DSPE-PEG(2000)PDP et de POPC sur des surfaces d'or à l'aide de la technique de SPR.

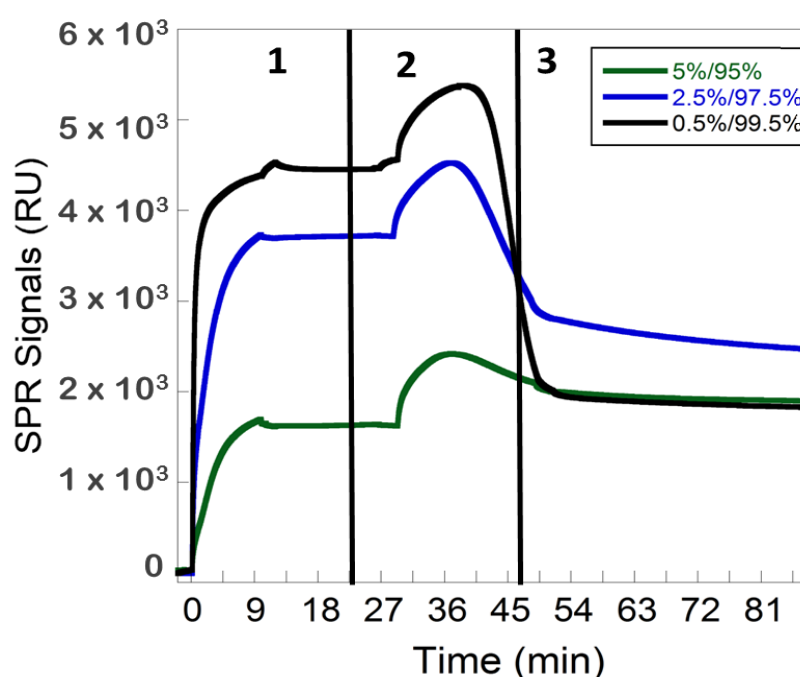


Figure 101 : Mesures obtenues en SPR suite à l'injection de suspension de liposomes de concentration 0,1 mg/mL sur une surface d'or avant et après ajout d'une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL. Les ratios molaires des liposomes utilisés sont les suivants : 95 mol% POPC/5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (vert), 97,5 mol% POPC/2,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (bleu), 99,5 mol% POPC/0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (noir). Les signaux SPR sont exprimés en unités de réponse (RU). La température est ajustée à 25°C.

La Figure 101 montre qu'après l'ajout des trois différentes suspensions de liposomes, les signaux mesurés (en RU) augmentent jusqu'à une valeur qui ne varie pas après le lavage opéré avec une solution tampon de PBS, ce qui correspond à une augmentation de masse ajoutée sur la surface d'or. Ces données confirment l'adsorption des liposomes sur la surface d'or. Une différence d'adsorption selon les compositions de liposomes injectées est

observée. En effet, l'adsorption pour les liposomes avec un ratio 95% POPC / 5% DSPE-PEG(2000)PDP est plus faible que pour celles de 99,5% POPC / 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP. Ce résultat est en accord avec celui obtenu en QCM-D. Cette différence d'adsorption de liposomes pourrait s'expliquer par la présence du DSPE-PEG(2000)PDP provoquant une fusion partielle des liposomes entre eux sur la surface, ceci induisant localement des bicouches lipidiques sur la surface²⁰.

Lors de l'ajout d'une solution d'alpha peptide, une augmentation de la masse est mesurée quand l'alpha peptide se fixe aux liposomes suivie d'une diminution rapide de la masse mesurée, induisant alors la rupture des liposomes. Enfin, une dernière phase stable est observée dans laquelle la bicouche lipidique est formée. Les signaux mesurés en fin d'expérience ne sont pas significativement différents.

Ainsi que nous l'avons auparavant expliqué, les masses acoustiques de surface et les masses de densité optique peuvent être obtenues (*cf. chapitre 2 paragraphe 2.2*). Les valeurs mesurées avec les techniques de QCM-D et SPR ainsi que les masses relatives à ces valeurs sont reportées dans le Tableau 8.

	QCM-D (n=4)		BIAcore (n=4)	
	ΔF (Hz)	Mass (Voigt-Voinova model) (ng/cm ²)	Response (RU)	Mass (ng/cm ²)
95%POPC/5%DSPE-PEG(2000)-PDP	-49.1 ± 5.3	1464 ± 514	1693 ± 180	156 ± 17
97.5%POPC/2.5%DSPE-PEG(2000)-PDP	-47.1 ± 4.6	1798 ± 248	2143 ± 161	197 ± 15
99.5%POPC/0.5%DSPE-PEG(2000)-PDP	-36.1 ± 6.9	765 ± 154	1656 ± 362	152 ± 33

Tableau 8 : Résultats obtenus en QCM-D et SPR à la fin du procédé de formation d'une tBLM sur une surface d'or (4 expériences différentes). Les shifts de fréquence de résonance mesurés en QCM-D ont été combinés à ceux de dissipation pour déterminer la densité de masse acoustique de surface en utilisant le modèle de Voigt-Voinova¹⁸ et les variations de réflectivité de surface (RU) obtenues à partir de la SPR sont converties en densité de masse optique de surface en utilisant un facteur de proportionnalité.

Les masses acoustiques et optiques mesurées à l'aide de ces deux méthodes de caractérisation suggèrent qu'approximativement 80 à 90 % de masse ajoutée sur la surface correspond à des molécules d'eau. Ce taux d'hydratation important, nous confirme la formation d'une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM) pour les trois ratios molaires testés.

2.4.2. Incorporation de l'AqpZ

Après avoir mis au point une tBLM à différents ratios molaires, les solutions de CFPS « témoin » et « AqpZ » ont été ajoutées pendant 3 heures sur les bicouches lipidiques.

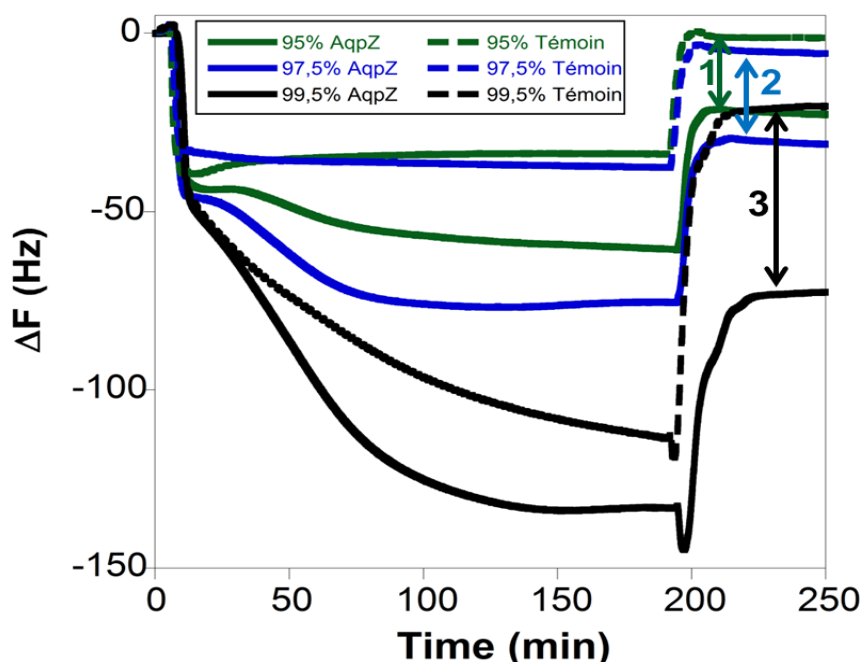


Figure 102 : Mesures de l'incorporation de l'Aquaporine Z par QCM-D sur tBLM formées à partir de solutions de liposomes à différents ratios molaires: 95 mol% POPC/5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (vert), 97,5 mol% POPC/2,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (bleu), 99,5 mol% POPC/0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP (noir). Les lignes solides correspondent au CFES « AqpZ » et les lignes pointillées au CFES « témoin ». 180μL de solution de CFPS ont été injectés par chambre de QCM-D dont la température a été ajustée à 30°C. Le flux a été interrompu pendant 3 heures avant le lavage de la surface avec la solution tampon de PBS.

Lors de l'ajout des solutions de CFPS « témoin » (Figure 102) sur les trois différentes tBLMs formées, une diminution de la fréquence de résonance est observée. Après 3 heures d'incubation, un lavage est effectué. Lors de cette étape, les fréquences de résonance augmentent rapidement jusqu'à atteindre une valeur de -25 Hz pour 0,5% / 99,5% mais proche de 0 Hz pour 2,5% / 97,5% et 5% / 95%. Ceci nous indique que dans le cas d'une tBLM de ratio molaire 0,5% / 99,5% du matériel du système d'expression reste présent sur la surface, ce qui n'est pas le cas pour les deux autres ratios molaires. Il est possible que ce résultat s'explique par le fait que le PEG présent empêcherait des éléments du CFPS de rester accrochés sur la bicouche lipidique.

Lors de l'ajout des solutions de CFPS « AqpZ », les fréquences de résonance diminuent au cours des 3 heures d'incubation. Lors de la phase de lavage, les fréquences de résonance remontent rapidement. Ceci nous indique que des protéines ont été produites par le système d'expression protéique acellulaire. Par comparaison des résultats obtenus lors de l'ajout d'une solution de CFPS « témoin » et « CFPS « AqpZ », nous notons que peu de

matériel protéique (25 Hz) reste lié à la surface après la phase de rinçage pour 2,5% / 97,5% et 5% / 95% (Tableau 9) alors que cette valeur est de 55 Hz pour le ratio 0,5%/99,5%.

tBLMs de ratios molaires	0,5% DPSE-PEG(2000)PDP / 99,5% POPC	2,5% DPSE-PEG(2000)PDP / 97,5% POPC	5% DPSE-PEG(2000)PDP / 95% POPC
$\Delta F(\text{AqpZ}) - \Delta F(\text{Control})$ (en Hz)	55	25	25

Tableau 9 : Différences de variation de fréquences de résonance obtenues pour les courbes d'AqpZ et celles des courbes témoin sur des tBLM de composition 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP/99,5% POPC ; 2,5% DSPE-PEG(2000)PDP/97,5% POPC ; 5% DSPE-PEG(2000)PDP/95% POPC.

Ceci suggère un effet inhibiteur du PEG sur la production de la protéine AqpZ par le système CFPS et aussi un effet de gêne pour son incorporation dans la tBLM.

Toutes ces données nous indiquent que le ratio de 0,5% / 99,5% comportant la plus faible proportion de PEG est le plus approprié pour la production et probablement pour l'incorporation de la protéine AqpZ.

Afin de déterminer si les protéines membranaires Aquaporine Z sont incorporées dans la tBLM, nous avons étudié la variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence pour l'Aquaporine Z et pour le témoin sur les tBLMs des trois compositions différentes (Figure 103).

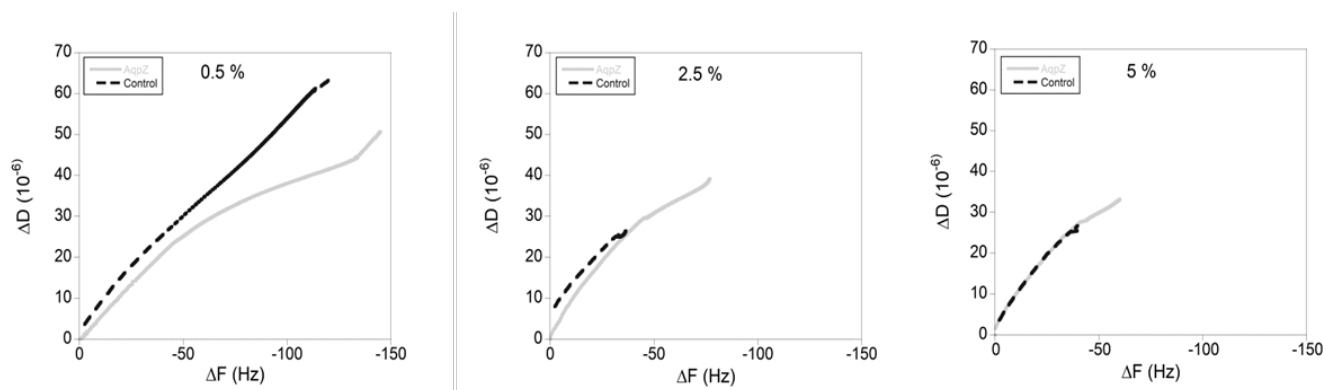


Figure 103 : Mesures de l'incorporation de l'Aquaporine Z par QCM-D sur tBLM formées à partir de solutions de liposomes à différents ratios molaires: 95 mol% POPC/5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP, 97,5 mol% POPC/2,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP, 99,5 mol% POPC/0,5 mol% DSPE-PEG(2000)PDP. Les lignes solides correspondent au CFES « AqpZ » et les lignes pointillées au CFES « témoin ».

Lors de l'ajout de solutions de CFPS « témoin » sur les trois différentes compositions de tBLMs, une proportionnalité entre la variation de dissipation et la variation de fréquence de résonance est observée signifiant que la viscoélasticité de la surface n'est pas modifiée par l'ajout du CFPS.

Lors de l'ajout de solutions de CFPS « AqpZ », une première phase est observée (de 0 à -50 Hz pour 0,5% / 99,5% ; de 0 à -40 Hz pour 2,5% / 97,5% et de 0 à -40 Hz pour 5% / 95%) dans laquelle la variation de dissipation augmente rapidement en rapport à la diminution de la fréquence et donc à l'augmentation de la masse (faible pente). Ceci correspond à une phase fortement viscoélastique, dite « molle ». Puis, une cassure de la pente apparaît (de -50 Hz à -130 Hz pour 0,5% / 99,5% ; de -40 Hz à -75 Hz pour 2,5% / 97,5% et de -40 Hz à -60 Hz pour 5% / 95%) durant laquelle la dissipation varie moins vite que la fréquence de résonance, ce qui est synonyme d'une modification de la viscoélasticité de la surface. Ceci correspond à une « rigidification » de la surface, de la masse étant ajoutée mais sans réel changement de la dissipation. Cette phase est interprétée comme la signature de l'incorporation d'Aquaporine Z au sein de la bicouche phospholipidique espacée et ancrée (tBLM) formée sur une surface d'or.

Ce résultat indique que les protéines membranaires sont incorporées dans les trois tBLMs composées à différents ratios de DSPE-PEG(2000)PDP et de POPC. Néanmoins, la quantité de protéines membranaires produites par le système d'expression protéique et incorporées dans les tBLMs semble plus importante pour le ratio 0,5% / 99,5%.

3. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de mettre au point une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM) dans laquelle des protéines membranaires intégrales peuvent être incorporées car elles nécessitent un espace plus important entre la bicouche lipidique et la surface d'étude. Dans un premier temps, des tBLMs ont été formées par fusion de liposomes comportant des molécules espaceurs de polyéthylène glycol (PEG-OCH₃ et PEG-NH₂) sur des surfaces de SiO₂. L'ajout de solution de CFPS contenant le plasmide portant le gène codant pour l'Aquaporine Z, a mis en évidence une absence ou une faible production protéique sans aucune incorporation de protéines. Un effet inhibiteur par le PEG sur le système d'expression protéique acellulaire a ainsi été proposé.

Dans un second temps, nous avons opté pour la mise au point d'une tBLM sur or en utilisant un PEG similaire mais dont la partie permettant l'ancrage est un disulfure. Les liposomes s'adsorbant intacts sur les surfaces d'or, une solution d'alpha peptide¹⁴, molécule facilitant la fusion, a été utilisée. Des liposomes composés des molécules DSPE-PEG(2000)PDP de différents ratios molaires (0,5%/99,5, 2,5%/97,5% et 5%/95%) ont été étudiés. L'incubation du système d'expression acellulaire induisant la production d'Aquaporine Z sur ces tBLMs nous a permis de montrer qu'une production de protéines membranaires était possible mais également que des protéines membranaires semblaient s'y incorporer. Il a également été mis en évidence que le ratio 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP / 99,5% POPC permet une production optimale et une incorporation plus efficace de protéine membranaire.

4. Références

1. Engel, A., Fujiyoshi, Y. & Agre, P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J.* **19**, 800–806 (2000).
2. Calamita, G. The Escherichia coli aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.* **37**, 254–262 (2000).
3. Savage, D. F., Egea, P. F., Robles-Colmenares, Y., Ili, J. D. O. & Stroud, R. M. Architecture and Selectivity in Aquaporins: 2.5 Å X-Ray Structure of Aquaporin Z. *PLoS Biol.* **1**, e2 (2003).
4. Scheuring, S. High resolution AFM topographs of the Escherichia coli water channel aquaporin Z. *EMBO J.* **18**, 4981–4987 (1999).
5. Kaufmann, S., Borisov, O., Textor, M. & Reimhult, E. Mechanical properties of mushroom and brush poly(ethylene glycol)-phospholipid membranes. *Soft Matter* **7**, 9267 (2011).
6. Kaufmann, S., Papastavrou, G., Kumar, K., Textor, M. & Reimhult, E. A detailed investigation of the formation kinetics and layer structure of poly(ethylene glycol) tether supported lipid bilayers. *Soft Matter* **5**, 2804 (2009).
7. Szleifer, I. Polymers and proteins: interactions at interfaces. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2**, 337–344 (1997).
8. Kingshott, P. & Griesser, H. J. Surfaces that resist bioadhesion. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **4**, 403–412 (1999).
9. Pei, J., Hall, H. & Spencer, N. D. The role of plasma proteins in cell adhesion to PEG surface-density-gradient-modified titanium oxide. *Biomaterials* **32**, 8968–8978 (2011).
10. Keller, C. A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* **75**, 1397–1402 (1998).
11. Merz, C., Knoll, W., Textor, M. & Reimhult, E. Formation of supported bacterial lipid membrane mimics. *Biointerphases* **3**, FA41 (2008).
12. Richter, R. P., Him, J. L. K. & Brisson, A. Supported lipid membranes. *Mater. Today* **6**, 32–37 (2003).
13. Keller, C. A. & Kasemo, B. Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance. *Biophys. J.* **75**, 1397–1402 (1998).
14. Cho, N.-J., Cho, S.-J., Cheong, K. H., Glenn, J. S. & Frank, C. W. Employing an Amphipathic Viral Peptide to Create a Lipid Bilayer on Au and TiO₂. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10050–10051 (2007).
15. Cho, N.-J., Frank, C. W., Kasemo, B. & Höök, F. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nat. Protoc.* **5**, 1096–1106 (2010).
16. Garcia-Manyes, S. & Sanz, F. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 741–749 (2010).
17. Wang, X., Shindel, M. M., Wang, S.-W. & Ragan, R. A Facile Approach for Assembling Lipid Bilayer Membranes on Template-Stripped Gold. *Langmuir* **26**, 18239–18245 (2010).
18. Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P. & Kasemo, B. Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **84**, 5443 (2000).
19. Voinova, M. V., Rodahl, M., Jonson, M. & Kasemo, B. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys. Scr.* **59**, 391–396 (1999).
20. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 513–526 (1991).
21. Wang, X., Shindel, M. M., Wang, S.-W. & Ragan, R. Elucidating Driving Forces for Liposome Rupture: External Perturbations and Chemical Affinity. *Langmuir* **28**, 7417–7427 (2012).

Chapitre 3 : Mise au point d'une membrane biomimétique

Dans ce travail de thèse, des membranes planes (bicouches lipidiques supportées (SLBs) et bicouches lipidiques ancrées et espacées (tBLMs)) dites « modèles » ont précédemment été mises au point. Or, leur composition ne reflète pas celle de membranes biologiques composées de nombreux lipides différents selon les organismes dont elles proviennent. A titre d'exemple, une bicouche lipidique de mitochondrie est composée à 48% de phosphatidylcholine (PC), 28% de phosphatidyléthanolamine (PE), 8% de phosphatidylinositol (PI) et 11% de diphosphatidylglycérol (DPG) tandis qu'une bicouche lipidique d'*E.coli* a pour composition 80% de PE, 15% de phosphatidylglycérol (PG) et 5% de diphosphatidylglycérol (DPG)¹. Une question se pose alors : la composition de la bicouche lipidique a-t-elle une influence sur l'expression de protéines induites par le CFPS et sur leur incorporation ? C'est l'objet de ce chapitre.

1. Formation d'une bicouche lipidique supportée (SLB) biomimétique

Il existe peu d'études sur la formation des bicouches lipidiques biomimétiques, de composition la plus proche possible d'une bicouche lipidique native. Dans ces quelques travaux, des membranes natives isolées, des extraits lipidiques commerciaux^{3,4,5}, ou des mélanges de lipides comportant un pourcentage important de lipides chargés négativement sont utilisés² sont utilisés. Notre objectif est de mettre au point une bicouche lipidique supportée (SLB) biomimétique plane ayant la composition la plus proche possible de celle d'une bicouche lipidique native bactérienne. Pour réaliser cela, notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un produit commercial, l'extrait total d'*E.coli* de chez Avanti Polar Lipids. Ce produit est issu de membranes d'*E.coli* et est composé (*en pourcentage massique*) de 57,5% de phosphatidyléthanolamine, 15,1% de phosphatidylglycérol, 9,8% de Cardiolipides ainsi que 17,6% de composants non identifiés.

1.1. Effet de la concentration en calcium sur la formation de SLB composée de lipides totaux extraits d'*E.coli*

Lors de l'étude du comportement d'extraits lipidiques totaux d'*E.coli*, Merz et coll.⁴ ont montré l'importance du calcium dans la fusion de liposomes composés de POPE : POPG (2/1 w/w) ou POPC : POPG (2 : 1 w/w) ou d'extraits lipidiques totaux. Toutes les expériences que nous avons menées jusqu'à présent ne nécessitaient pas l'utilisation de ces cations divalents. La première étape va donc consister à étudier l'effet de la concentration molaire de CaCl₂ sur les liposomes composés de lipides d'*E.coli*. Quatre concentration de calcium seront ajoutées à une solution tampon d'HEPES 10 mM et NaCl 150 mM, pH 7,4 (0 mM, 2

mM, 5 mM et 20 mM). Le comportement des suspensions de liposomes d'*E.coli* préparées avec l'une des quatre solutions tampon a été suivi par QCM-D (Figure 104).

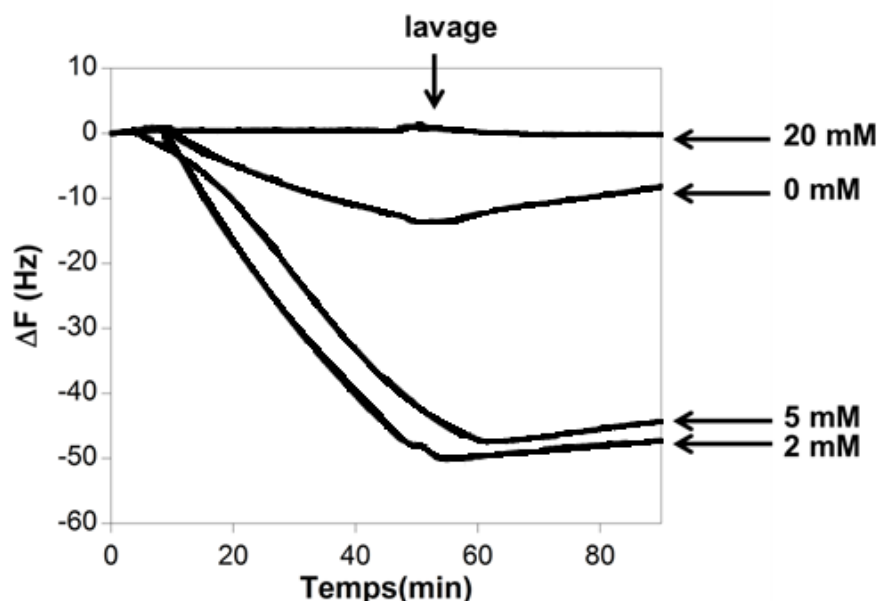


Figure 104 : Impact de la concentration en CaCl_2 sur des liposomes composés de 100% d'*E.coli* mesurée avec la technique de QCM-D. Le CaCl_2 est ajouté au tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Les suspensions de liposomes de concentration 0,1 mg/mL à la vitesse de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ sont ajoutées pendant 45 minutes. Un rinçage avec une solution tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2mM, pH 7,4 est ensuite réalisé pendant 45 minutes.

En absence d'ions Ca^{2+} dans la suspension de liposomes injectée dans la chambre de QCM-D, la fréquence de résonance diminue légèrement pendant 45 minutes. Après une phase de lavage qui est destinée à éliminer le matériel non adsorbé sur la surface de SiO_2 , la fréquence de résonance augmente très faiblement. Après 90 minutes, la fréquence de résonance mesurée n'est que de -6 Hz indiquant que peu de matériel est resté adsorbé sur la surface. De la même façon, la présence d'ions Ca^{2+} à très forte concentration (20 mM) s'accompagne d'une absence totale de variation de la fréquence, même après la phase de lavage. Ceci indique que dans ces conditions aucun matériel n'est adsorbé sur la surface. Pour des concentrations intermédiaires en CaCl_2 (2 mM et 5 mM), la fréquence de résonance diminue significativement ($\Delta f = -52$ Hz pour 2 mM et $\Delta f = -48$ Hz pour 5 mM) et le lavage provoque une faible remontée de la fréquence de résonance qui se stabilise après 90 minutes à -48 Hz pour 2 mM et à -42 Hz pour 5 mM, signifiant que du matériel est adsorbé sur la surface.

Nos résultats reproduisent parfaitement ceux de Merz et coll.⁴ qui avaient montré que le calcium a un rôle déterminant sur le comportement des liposomes de composition proche de la membrane d'*E.coli*. Ce rôle est d'autant plus important avec une concentration de 2 mM ou de 5 mM. Comme les résultats sont identiques entre 2 et 5 mM, nous avons choisis d'utiliser la concentration de CaCl_2 à 2 mM dans la suite de ces travaux. Néanmoins, cette concentration de calcium de 2 mM ne semble pas suffisante pour induire la formation d'une bicouche lipidique. En effet, la valeur relevée de -50 Hz après le rinçage, est deux fois supérieure à celle attendue pour une SLB⁶. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : 1) les liposomes sont adsorbés sur la surface, 2) une multicouche lipidique est formée sur la surface ou 3) une bicouche partielle dans laquelle des liposomes auraient fusionnés dans différentes zones est produite.

Afin de déterminer laquelle des hypothèses formulées est la plus appropriée pour expliquer ce résultat, nous avons réalisé des expériences complémentaires avec la technique de FRAP (Figure 105, Figure 106). Celle-ci permet de déterminer si les liposomes sont intacts ou si une bicouche lipidique est formée partiellement ou complètement sur la surface.

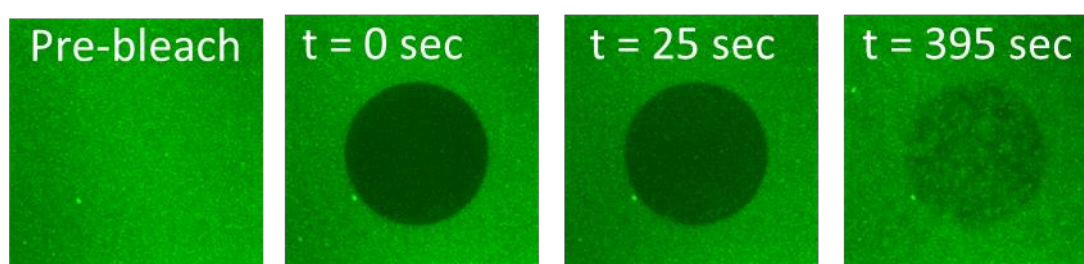


Figure 105 : Images obtenues avec la technique de FRAP avant et après photoblanchiment d'une zone de 40 μm de liposomes de composition 100% *E.coli* incubés 30 minutes sur une surface de verre. Un traitement oxydatif de la surface de verre est effectué avec un plasma O_2 pour la rendre hydrophile. Des suspensions d'*E.coli* sont ensuite ajoutées sur la surface. Un lavage avec du tampon de solution HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM est opéré à deux reprises suivi de deux lavages avec le tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM. Le photoblanchiment est effectué avec un laser de puissance 15 mW à une longueur d'onde de 488 nm. Après le photoblanchiment un recouvrement partiel de la fluorescence est observé. Pour plus de détails techniques, se référer à la partie II : matériel et méthodes.

Le photo-blanchiment d'une zone comportant les liposomes d'*E.coli* dans lesquels ont été ajoutés le NBD-PC une molécule lipidique fluorescente à 1% (ratio molaire), provoque l'apparition d'une zone noire, correspondant à la destruction de la fluorescence au niveau de cette région. Après 395 secondes la zone photo-blanchie est moins noire signifiant que les molécules lipidiques fluorescentes sont mobiles. Néanmoins, toute la zone ne retrouve pas une fluorescence indiquant que les molécules sont partiellement mobiles.

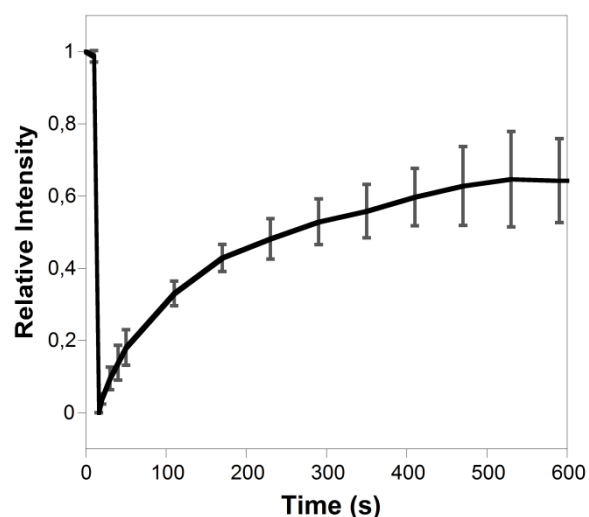


Figure 106 : Cinétique de recouvrement de fluorescence d'une SLB après photoblanchiment. L'intensité relative moyenne de fluorescence recouvrée en fonction du temps est obtenue à partir des images de FRAP avant et après photoblanchiment d'une zone de 40 μm de liposomes de composition 100% *E.coli* incubés 30 minutes sur une surface de verre rendue hydrophile par un traitement oxydatif effectué par un plasma O_2 . La moyenne de 5 mesures a été réalisée et la courbe est tracée avec les écart-types. (Pour plus de précisions, la méthode est décrite dans la *partie II : matériel et méthodes*).

La Figure 106 illustre la cinétique de récupération de la fluorescence au niveau de la région photo-blanchie. Pour cela, les intensités des différentes zones (la zone photo-blanchie et la zone entière) avant et après photo-blanchiment ont été mesurées. Comme montré à la Figure 105, l'intensité relative moyenne mesurée est de 0,6, 600 minutes après le photo-blanchiment, indiquant que seulement 60% de la fluorescence est réapparue. Si des liposomes avaient été adsorbés de façon intacte à la surface, la mobilité de fluorescence serait nulle tandis que si une bicouche lipidique complète avait été formée celle-ci serait de l'ordre de 90-100%. Par conséquent, la mobilité ici mesurée à 60% suggère fortement que des liposomes intacts restent adsorbés à la surface et qu'il y a eu formation incomplète d'une bicouche lipidique sur la surface.

Pour confirmer cette hypothèse, une image de la surface par la microscopie à force atomique en milieu liquide a été réalisée. Pour cela, la surface d'étude a été remplacée par du mica, surface plane permettant d'obtenir une meilleure résolution. L'image de hauteur obtenue (Figure 107 (A)) et celle de déflexion verticale (Figure 107 (B)) montrent une surface sur laquelle des probables patches de lipides ou petits domaines de bicouche lipidique apparaissent. Cette image est différente de celle présentée dans le chapitre 1 (Figure 77) pour une SLB composée de 100% de POPC montrant une surface totalement plane et sans aucun défaut.

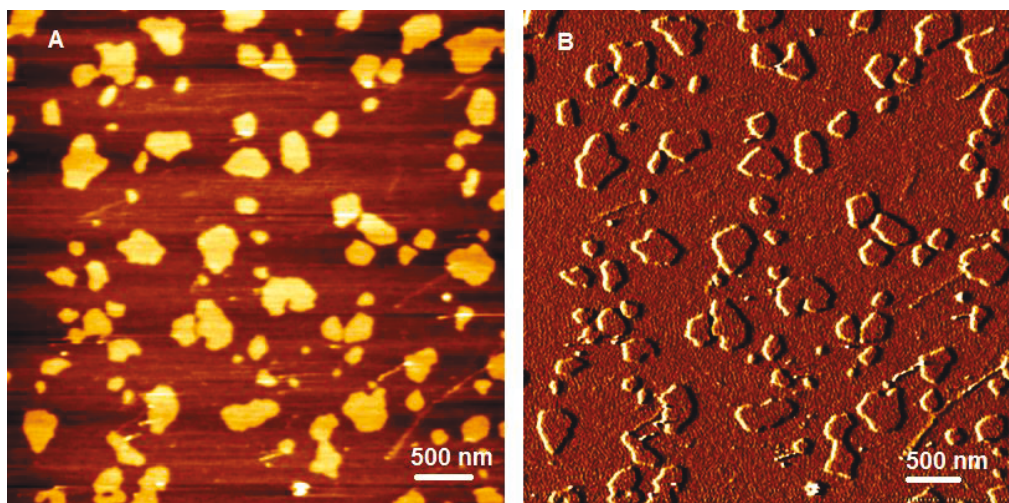


Figure 107 : Images obtenues par AFM après ajout d'une suspension de liposomes d'*E.coli* sur une surface de mica. A) Image de hauteur (échelle comprise entre 0 et 1 nm) ; B) Image de déflexion verticale. La surface de mica est préalablement clivée avant que la suspension de liposomes préparée avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl, 150 mM, CaCl_2 2mM ne soit ajoutée pendant 30 minutes puis rincée à deux reprises avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl, 150 mM, CaCl_2 2mM puis à deux reprises avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM.

Afin de connaître la nature de ces éléments lipidiques, un profil de hauteur a été réalisé pour déterminer la hauteur de ces structures (Figure 108). Les résultats de hauteur de 0,5 nm, obtenus avec le mode contact ne montrent pas la présence de patches de bicouche lipidique sur la surface. Le mode contact pouvant parfois être sujet à de fortes interactions entre la pointe et la bicouche lipidique⁷, nous avons vérifié ce résultat en utilisant le mode contact intermittent (« *tapping mode* »). Ce mode d'imagerie, nous indique que la hauteur de ces structures lipidiques est de l'ordre de 3-4 nm, suggérant qu'il s'agit de patches de bicouches lipidiques.

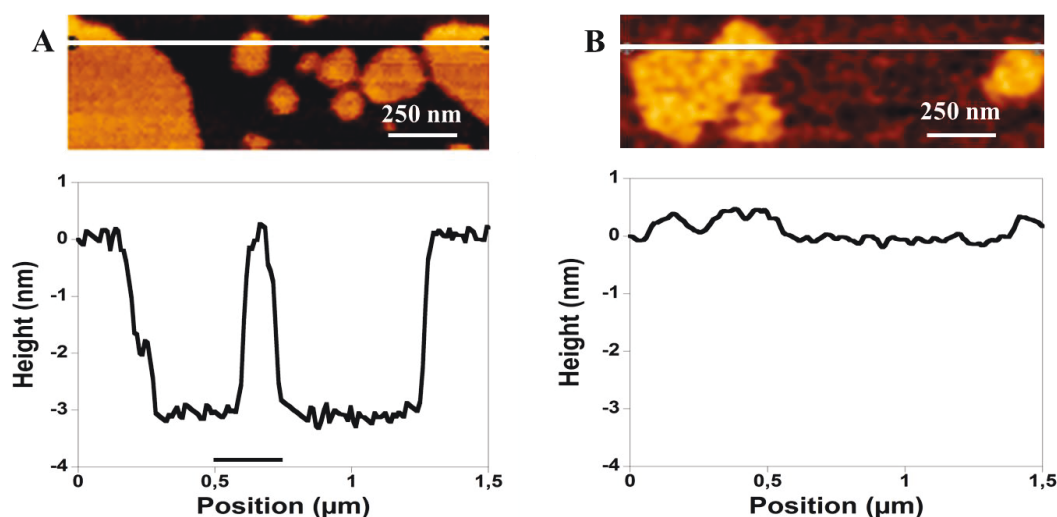


Figure 108 : Images AFM et profils de hauteur images de liposomes composés d'extrait total d'*E.coli* incubés sur une surface de mica, par mode contact intermittent (*tapping mode*) (A) et mode contact (B). La surface de mica est préalablement clivée avant que la suspension de liposomes préparée avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl, 150 mM, CaCl_2 2mM ne soit ajoutée pendant 30 minutes puis rincée à deux reprises avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl, 150 mM, CaCl_2 2mM puis à deux reprises avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM. La taille de l'image est 0,5 x 1,5 μm .

Ces images montrent donc des regroupements de lipides en zones concentrées caractéristiques de la formation d'une bicouche partielle. Cette analyse AFM confirme l'hypothèse d'une bicouche lipidique partielle formée.

En conclusion, nous avons ainsi confirmé l'effet de la concentration de CaCl_2 exposé par Merz et coll.⁴ sur le comportement des liposomes d'*E.coli* ajoutés sur une surface de SiO_2 , de verre ou de mica. La concentration de CaCl_2 retenue pour les expériences de formation de bicouches lipidiques a été de 2 mM. Cependant, nous n'avons obtenu qu'une SLB partielle. Notre objectif de former une SLB complète n'est donc pas atteint.

1.2. Recherche des conditions pour former une SLB biomimétique complète

Les liposomes composés exclusivement de molécules lipidiques synthétiques POPC étant connus pour fusionner facilement sur une surface de SiO_2 (cf. *Chapitre 1*), pour atteindre notre objectif, nous avons envisagé de fabriquer des liposomes comportant des molécules lipidiques d'*E.coli* et d'autres de POPC. Les ratios molaires retenus pour composer des liposomes à partir de ces deux molécules lipidiques (extrait total d'*E.coli* et POPC) sont : 100%/0%, 90%/10%, 70%/30%, 68%/32%, 50%/50%, 0%/100% (Figure 109).

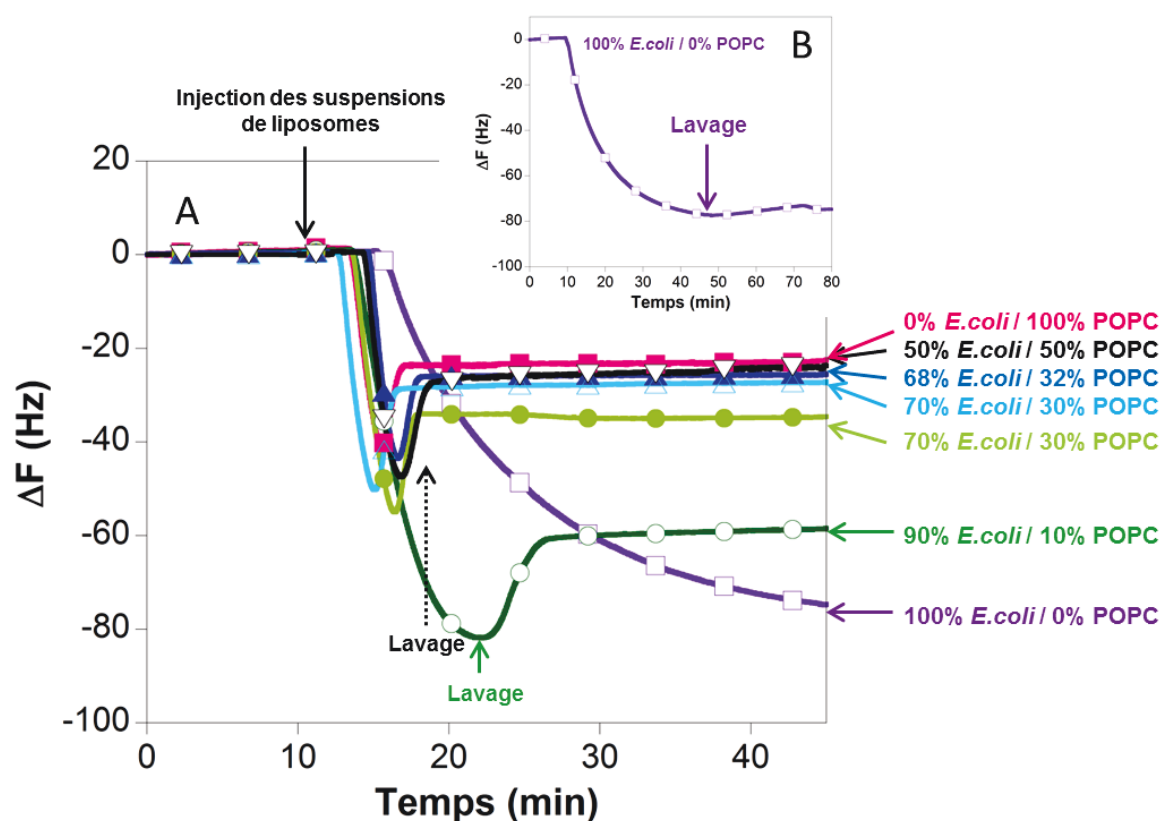


Figure 109 : Suivi en temps réel par QCM-D de l'ajout de suspensions de liposomes de compositions différentes ajoutées sur une surface de SiO₂ dans le but de former une bicouche lipidique biomimétique. A) Différents ratios molaires des liposomes (100% d'*E.coli* / 0%POPC, 90% *E.coli* / 10% POPC, 70% *E.coli* / 30%POPC, 68% *E.coli* / 32% POPC, 50% *E.coli* / 50%POPC, 0% *E.coli* / 100% POPC) sont ajoutés sur la surface du quartz. B) En insert, le ratio molaire 100% *E.coli* / 0%POPC dont le lavage est effectué après 45 minutes est représenté. La surface de SiO₂ est rendue hydrophile par un traitement oxydatif utilisant un plasma à oxygène. Les liposomes sont préparés avec une solution tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2mM. Les suspensions de liposomes de concentration 0,1 mg/mL à la vitesse de 100 µL/min sont ajoutés pendant 45 minutes pour 100% *E.coli* / 0% POPC, pendant 10 minutes pour le ratio 90% *E.coli* / 10% POPC et pendant 5 minutes pour toutes les autres compositions lipidiques. Un rinçage avec une solution tampon est ensuite réalisé pendant 45 minutes. Le tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2mM est ensuite injecté afin de laver la surface et d'éliminer le matériel non adsorbé sur la surface.

L'ajout de liposomes composés exclusivement de POPC, montre une diminution de la fréquence de résonance (jusqu'à -50 Hz) correspondant à une adsorption de matériel qui n'est autre que celle des liposomes, seuls éléments ajoutés sur la surface de SiO₂. Il s'ensuit une remontée des signaux, montrant une désorption de matériel qui correspond à un relargage de solution aqueuse faisant suite à la fusion des liposomes. Après le lavage avec la solution tampon, une valeur de fréquence de résonance de -25 Hz est relevée. Cette valeur est caractéristique de la formation d'une bicouche lipidique supportée qui recouvre toute la surface comme l'ont démontré Keller et Kasemo^{6,8}.

Dans le cas de liposomes composés exclusivement d'*E.coli*, la fréquence de résonance diminue pendant 45 minutes après l'injection de la suspension de liposomes signifiant implicitement qu'une masse est ajoutée sur la surface, une adsorption de matériel est donc observée correspondant à celle des liposomes. Après l'ajout de solution tampon (Figure 109(B)), une très faible augmentation de la fréquence de résonance est constatée, indiquant que peu de matériel est éliminé. Après 90 minutes, la valeur de la fréquence de résonance relevée sur ce graphique est de -65 Hz indiquant que du matériel est adsorbé sur la surface mais qu'une SLB recouvrant toute la surface n'est pas formée (cf. paragraphe 1.1).

Dans le cas de différents ratios molaires de ces deux types de molécules lipidiques (extrait total d'*E.coli* et POPC), un comportement similaire à celui des liposomes composés de 100% de POPC est observé indiquant une adsorption de liposomes. Nous notons cependant que les valeurs mesurées après l'étape de lavage sont différentes selon les ratios molaires testés (-55 Hz pour 90 % d'extrait total d'*E.coli*, -30 Hz pour 70 % d'extrait total d'*E.coli*, -27 Hz pour 60 % d'extrait total d'*E.coli*, -25 Hz pour 62 % et 50 % d'extrait total d'*E.coli*). Pour des ratios 90 % d'extrait total d'*E.coli* / 10% POPC, le comportement est donc proche de ce que nous avons observé pour 100% d'extrait total d'*E.coli*. ($\Delta f = -57$ Hz) suggérant la formation d'une bicouche lipidique partielle. Pour des ratios d'extrait total d'*E.coli* et de POPC intermédiaire (30 % / 70 % et 60 % / 40 %), les valeurs après lavage (-30 Hz, -27 Hz) sont proches de celle obtenue pour des liposomes composés exclusivement de POPC indiquant que la bicouche lipidique supportée recouvre quasiment toute la surface de SiO₂. En revanche, pour un ratio molaire 62 % d'extrait total d'*E.coli* / 38 % POPC, les valeurs de -25 Hz comparables à celle d'une SLB formée pour POPC pur sont relevées.

En conclusion, ces expériences ont permis de déterminer un ratio molaire de 62% *E.coli* / 38% POPC qui permettrait de former une bicouche lipidique supportée complète pouvant s'apparenter à une bicouche lipidique proche de celle qui caractérise la membrane d'*E.coli*.

Pour vérifier que cette SLB complète est présente sur la surface, des expériences utilisant les techniques de FRAP et d'AFM doivent être réalisées. Nous utilisons dans un premier temps la technique de FRAP afin de mesurer la mobilité des molécules lipidiques fluorescentes (NBD-PC) ajoutés à trois différentes suspensions (100% de POPC, 100% d'extrait total d'*E.coli* et 68% d'extrait total d'*E.coli* / 32% POPC) (Figure 110).

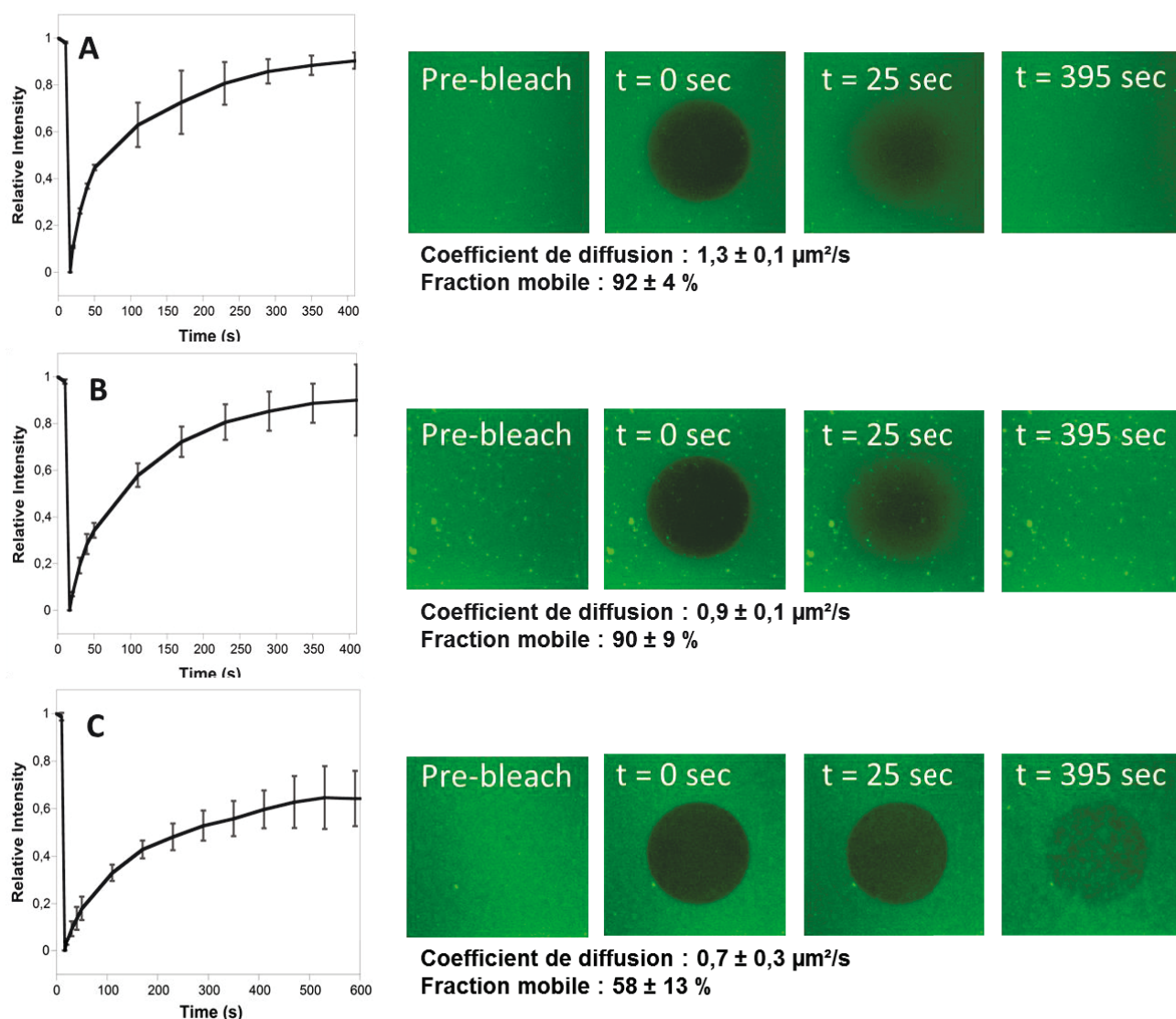


Figure 110 : Images et intensité relative moyenne de fluorescence recouvrée en fonction du temps obtenues avec la technique de FRAP avant et après photoblanchiment d'une zone de $40 \mu\text{m}$ de liposomes de différentes compositions incubés 30 minutes sur une surface de verre. A) 0% *E.coli* / 99% POPC / 1% NBD-PC ; B) 61,5% *E.coli* / 31,5% POPC / 1% NBD-PC; C) 99% *E.coli* / 0% POPC / 1% NBD-PC. Les coefficients de diffusion et fractions mobiles déterminées ont été indiqués. Un traitement oxydatif de la surface de verre est effectué avec un plasma O_2 pour la rendre hydrophile. Des suspensions de liposomes sont ensuite ajoutées sur la surface. Un lavage avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM est opéré à deux reprises suivi de deux lavages avec le tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM. Le photoblanchiment est effectué avec un laser de puissance 15 mW à une longueur d'onde de 488 nm. Après le photoblanchiment un recouvrement partiel de la fluorescence est observé. Pour plus de précisions, la méthode est décrite partie II : matériel et méthodes.

Dans le cas où des suspensions de liposomes de composition 99% *E.coli* / 1% NBD-PC sont ajoutées sur la surface de verre, nous observons après le photo-blanchiment montrant une zone noire sur la surface, une réapparition progressive de la fluorescence. Nous notons que 395 secondes après le photo-blanchiment, la zone photoblanchie est moins noire signifiant une mobilité des molécules lipidiques fluorescentes. Cette mobilité est confirmée par l'obtention d'un coefficient de diffusion de $0,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Néanmoins, toute la zone ne retrouve pas une fluorescence indiquant que les molécules sont partiellement mobiles

(fraction mobile de 60%). Il est connu que si seuls des liposomes sont adsorbés intacts sur la surface, aucune réapparition de la fluorescence n'est observée. Pour 100% d'extrait total d'*E.coli*, un recouvrement partiel de fluorescence de la surface est donc observé confirmant la formation d'une bicouche partielle.

Le cas où des suspensions de liposomes de composition 100% de POPC sont ajoutées sur la surface a été précédemment expliqué (*cf. chapitre 1*). Nous avons ainsi montré que les molécules lipidiques sont mobiles et que leur coefficient de diffusion est de $1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ signifiant qu'une bicouche lipidique supportée est formée.

Pour des liposomes de composition lipidique 68% d'extrait total d'*E.coli* / 32% POPC le comportement observé est similaire à celui décrit pour des liposomes composés exclusivement de POPC indiquant que les molécules lipidiques sont mobiles (fraction mobile de 90%) et diffusent sur la surface (coefficient de diffusion calculé de $0,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Ceci confirme, comme démontré dans la littérature, qu'une bicouche lipidique supportée recouvrant toute la surface est formée⁴.

Les analyses réalisées avec la technique de FRAP confirment que pour des suspensions de liposomes de composition 100% POPC et 68% d'extrait total d'*E.coli* / 32% de POPC, une SLB complète est formée. En revanche, pour une composition de liposomes de 100% d'extrait total d'*E.coli*, les caractéristiques d'une bicouche lipidique partielle formée sont confirmées.

Pour apporter une confirmation visuelle supplémentaire aux résultats obtenus avec les deux précédentes techniques, la technique AFM en milieu liquide a été utilisée. Pour cela, des surfaces de mica sur lesquelles des suspensions de liposomes composées de molécules lipidiques d'extrait total d'*E.coli* et de POPC selon les ratios (100%/0%, 85%/15%, 68%/32%, 0%/100%) ont été ajoutées pendant 30 minutes (Figure 111).

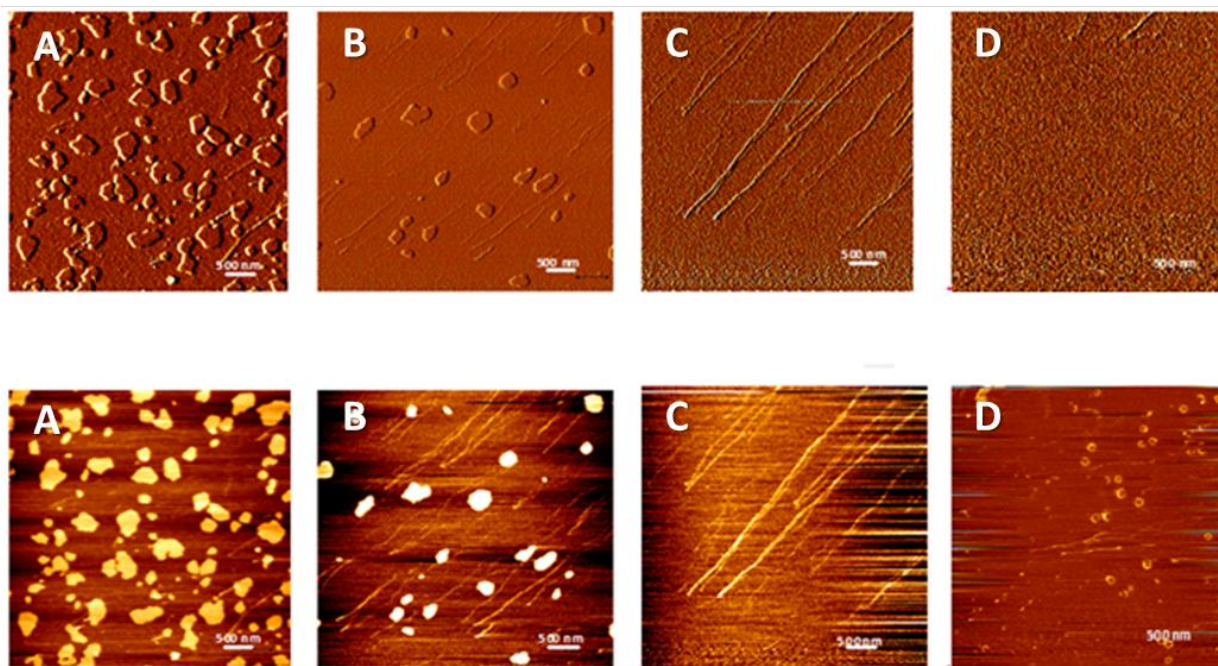


Figure 111 : Images obtenues avec la technique de microscopie à force atomique (AFM) en milieu liquide de différentes suspensions de liposomes de ratios d'*E.coli* et de POPC (image : 5 μm x 5 μm , échelle : 0-1 nm) A) 100% *E.coli* / 0% POPC, B) 85% *E.coli* / 15% POPC, C) 62% *E.coli* / 38% POPC et D) 0% *E.coli* / 100% POPC, sur une surface de mica préalablement clivée. Le mode d'imagerie est le mode contact. Les suspensions de liposomes ont été incubées 30 minutes puis rincées à deux reprises avec la solution tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, 2 mM CaCl_2 puis à deux reprises avec du tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM.

Pour des liposomes composés de 100% de POPC ajoutées sur la surface, une surface plane est observée. En effet, aucun patch ou petit domaine de bicouche lipidique n'est visible. Ceci indique, comme présenté dans le chapitre 1, la formation d'une bicouche lipidique supportée complète sur la surface.

L'observation de liposomes de composition 62% *E.coli* / 38% POPC ajoutés sur la surface de mica est similaire à celle de 100% de POPC pour laquelle une bicouche lipidique supportée est formée. En effet, aucun patch ou petit domaine de bicouche lipidique n'est visible. Ceci confirme la formation d'une bicouche lipidique supportée complète sur la surface.

Pour des liposomes composés de 100% d'*E.coli*, des patchs de lipides ou petits domaines de bicouche lipidique sont observés. Leur présence est également constatée pour des liposomes composés d'un ratio 85% d'*E.coli* / 15% POPC. Néanmoins, ils sont quantitativement moins nombreux sur la surface de mica. Leur taille comprise entre 100 et 600 nm est supérieure aux liposomes de 100 nm de diamètre moyen préparés puis ajoutés sur la surface. Ceci suggère que pour ces deux compositions lipidiques, des liposomes ont fusionnés pour former des patchs de bicouches lipidiques. Le fait que leur nombre soit plus faible pour la composition 85% *E.coli* / 15% POPC, indique que plus de liposomes auraient fusionnés ensemble sur la surface.

En conclusion, nous avons par la combinaison de trois techniques de caractérisation (AFM, QCM-D et FRAP), montré que la formation d'une bicouche lipidique complète « biomimétique » c'est-à-dire se rapprochant le plus possible de la membrane d'*E.coli* est obtenue en mélangeant un extrait total d'*E.coli* et des molécules lipidiques synthétiques POPC selon le ratio molaire 68 % / 32 %.

1.3. Effet de la composition lipidique de la SLB sur la production de l'alpha hémolysine-eGFP

La bicouche lipidique supportée biomimétique mise au point, nous voulons maintenant déterminer si ce type de SLB est adapté à la production de protéines membranaires alpha hémolysine-eGFP par un système CFPS mais également à l'incorporation de ces protéines dans la bicouche lipidique.

Les solutions de (CFPS) contenant ou non (témoin) le plasmide portant le gène codant la protéine AH-eGFP ont été injectées sur deux types de SLB, l'une composée de 100% de POPC et l'autre de 68% d'extrait total d'*E.coli* / 32% POPC.

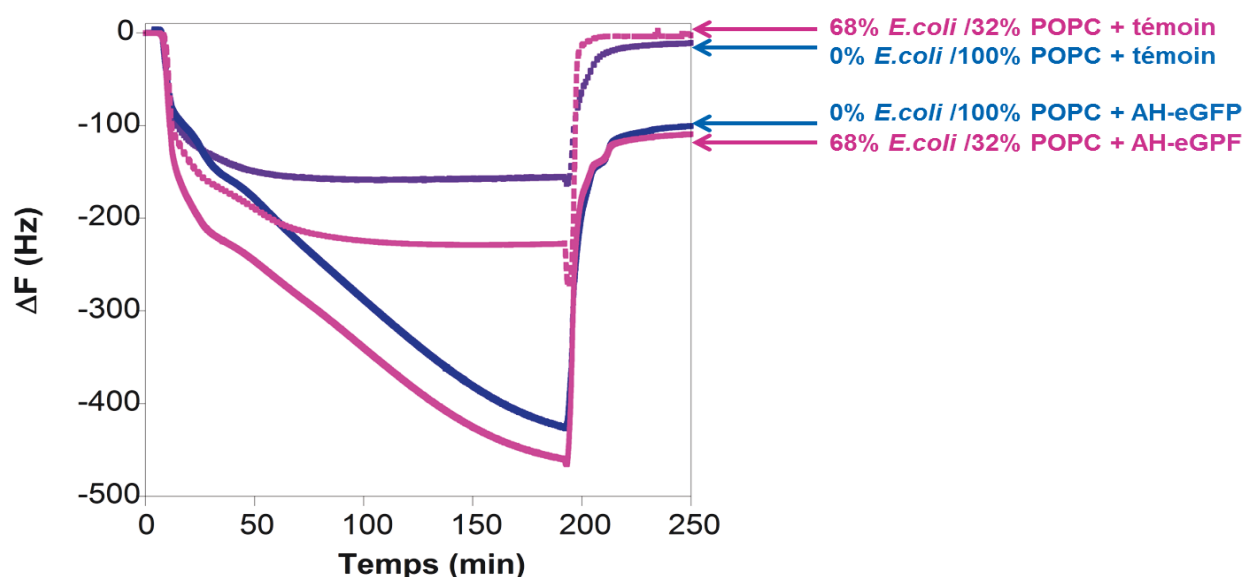


Figure 112 : Mesures de l'incorporation de l'alpha hémolysine-eGFP et d'un contrôle (sans plasmide ajouté dans le CFPS) par QCM-D sur SLBs formées à partir de solutions de liposomes de ratio molaire 68% *E.coli* / 32% POPC et 100% POPC. Une fois les SLBs formées, la température de la chambre de QCM-D est ajustée à 30°C. Après stabilisation des signaux, la mesure est réinitialisée (non montré sur la figure) puis les solutions de CFPS sont incubées pendant 3 heures avant rinçage avec du tampon de solution.

Suite à l'injection des solutions de CFPS, la fréquence de résonance diminue rapidement (-100 /-120 Hz) en raison du matériel du système d'expression ajouté sur les bicouches lipidiques (Figure 112).

Lors de l'ajout du CFPS témoin sur une SLB composée exclusivement de molécules lipidiques de POPC, nous notons une faible diminution de la fréquence (-160 Hz) qui ne varie pas après 120 minutes d'expression. Le lavage de la chambre par le tampon s'accompagne d'une remontée très rapide de la fréquence de résonance qui revient à la valeur initiale de 0 Hz indiquant que le matériel de CFPS ajouté sur la SLB est éliminé. Un comportement similaire est observé pour le CFPS témoin incubé sur une SLB biomimétique.

Lors de l'incubation du CFPS contenant le gène de l'AH-eGFP sur une SLB composée exclusivement de molécules lipidiques de POPC une diminution de la fréquence importante et continue sur 3 heures est constatée. Le lavage effectué après 3 heures d'expression protéique met en évidence une remontée des signaux à une valeur de -120 Hz signifiant que du matériel est retenu sur la surface. Il en est de même pour l'expression d'AH-eGFP sur une SLB biomimétique avec une valeur de production après de 3 heures légèrement plus faible que sur POPC mais avec une valeur mesurée après le lavage identique.

Le même comportement est observé pour les témoins mais également pour l'expression d'AH-eGFP sur les SLBs de deux compositions différentes. Les différences observées entre l'AH-eGFP et le témoin sur les deux SLBs sont de -120 Hz dans les deux cas signifiant que la protéine AH-eGFP est produite sur la surface. Ceci confirme qu'il n'y a aucun impact du changement de composition lipidique de la bicouche lipidique supportée sur la production et l'adsorption de protéines produites par un système CFPS.

Pour déterminer si les protéines sont incorporées dans les deux types de SLB, une étude de la modification de viscoélasticité de surface a été réalisée. Pour cela, la variation de la dissipation en fonction de la variation de fréquence de résonance a été tracé (Figure 113).

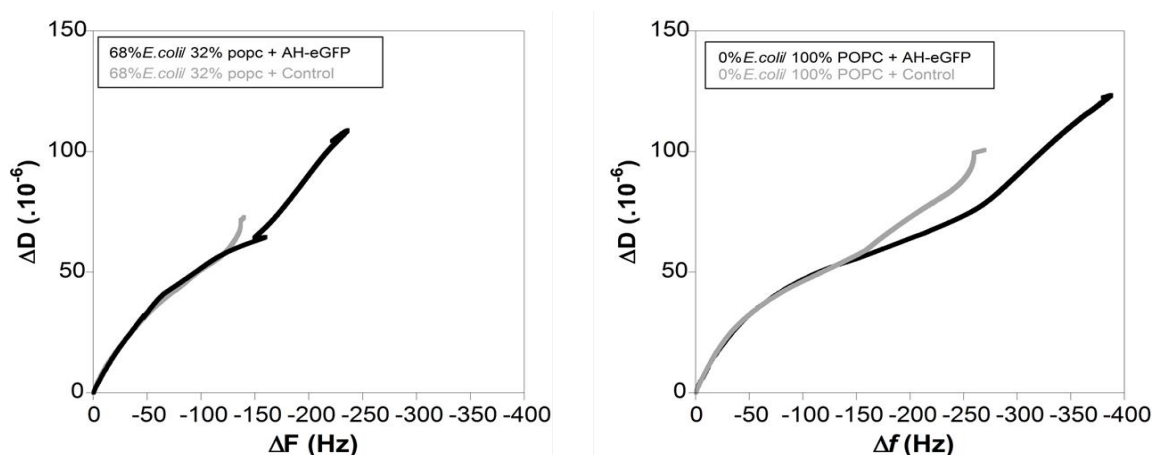


Figure 113 : Variations de la dissipation en fonction de la variation de fréquence obtenues pour l'AH-eGFP et le témoin (sans ajout de plasmide dans le CFPS) par QCM-D sur des SLBs de composition A) 68% *E.coli* / 32% POPC et B) 100% POPC. Une fois les SLBs formées, la température de la chambre de QCM-D est ajustée à 30°C. Après stabilisation des signaux, la mesure est réinitialisée (non montré sur la figure) puis les solutions de CFPS sont incubées pendant 3 heures avant rinçage avec du tampon de solution.

Le témoin incubé sur la SLB de composition 68 % d'extrait total d'*E.coli* et 32 % de POPC montre une proportionnalité (de 0 à -130 Hz) entre la variation de la dissipation et la fréquence de résonance (Figure 113 (A)) indiquant une absence de variation de la viscoélasticité de la surface. Le même comportement est observé pour le témoin incubé sur la SLB de composition 100 % de POPC.

Dans le cas où une solution de CFPS contenant le plasmide portant le gène de l'alpha hémolysine-eGFP est injectée, nous observons une première pente linéaire (de 0 à -130 Hz) pour laquelle la variation de dissipation est proportionnelle à la variation de fréquence. Puis, une cassure de la pente apparaît durant laquelle la dissipation varie moins vite que la fréquence de résonance, ce qui est synonyme d'une modification de la viscoélasticité de la surface. La même expérience a été réalisée sur une SLB de composition 100 % de POPC. Lors de l'ajout du CFPS exprimant l'AH-eGFP, la relation entre la variation de dissipation et la variation de fréquence est proportionnelle de 0 à -270 Hz. Puis, une cassure de la pente apparaît durant laquelle la dissipation varie moins vite que la fréquence de résonance. Ceci indique que la viscoélasticité de la surface est modifiée signifiant que les protéines sont incorporées dans la membrane.

En conclusion, la production d'AH-eGFP sur une SLB composée de 100% de POPC ou de 68% d'extrait total d'*E.coli* / 32% POPC est identique. Ce résultat nous indique que la composition lipidique d'une SLB ne semble pas avoir d'incidence sur l'incorporation des protéines membranaires. Ceci est en accord avec les travaux de l'équipe de Swartz⁹ sur l'expression de protéines par un système d'expression acellulaire dans des liposomes. Il a ainsi montré que l'insertion de protéines AqpZ dans des bicouches lipidiques (*sous forme de liposomes*) de composition 75% PE / 25% PG (wt/wt) en comparaison à l'insertion de ces protéines dans des liposomes comportant des molécules lipidiques DOPC, ne présentait pas de différences.

2. Formation d'une tBLM biomimétique et son impact sur la production d'Aquaporine Z

Suite à la mise au point de SLB biomimétique sur SiO₂, des expériences avec des tBLMs biomimétiques sont envisagées afin d'étudier l'incidence de la composition lipidique d'une tBLM sur la production et l'incorporation de l'aquaporine Z.

2.1. Formation d'une tBLM biomimétique

Dans une première partie nous nous intéressons donc à la mise au point d'une tBLM biomimétique sur une surface d'or en nous servant des résultats obtenus pour une SLB biomimétique. Une étude par QCM-D de différents ratios molaires d'*E.coli* et de POPC est envisagée. Le ratio de 0,5% de DSPE-PEG(2000)PDP optimal pour la formation de tBLM sur or démontré dans le chapitre 2 demeure inchangé.

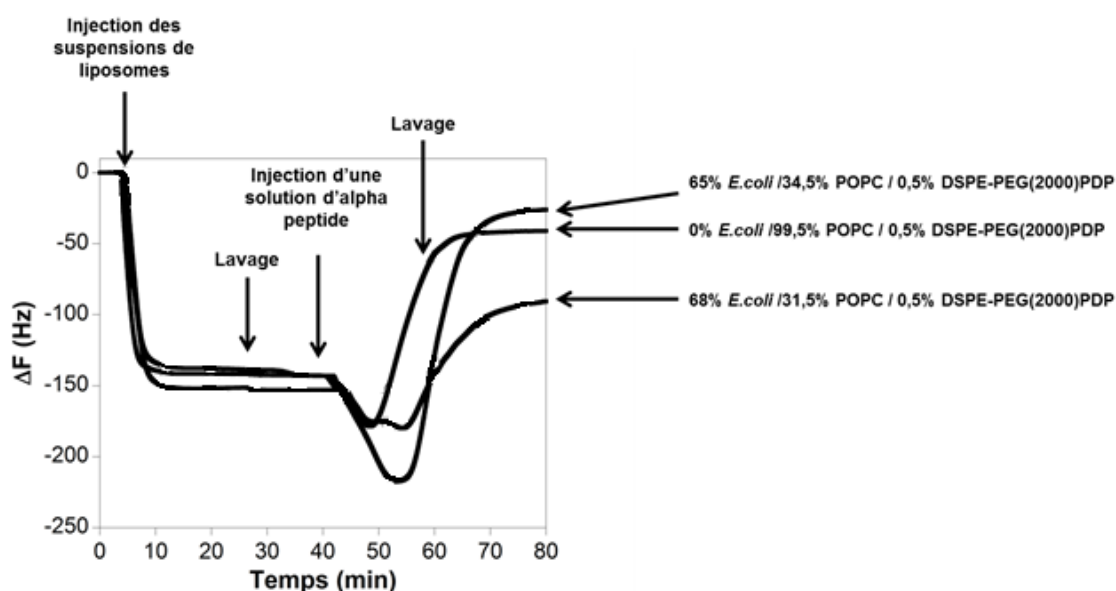


Figure 114 : Formation de bicouches lipidiques espacées et ancrées (tBLMs) sur une surface d'or mesurée par QCM-D. Différents ratios molaires des liposomes (68% d'*E.coli* / 31,5% de POPC / 0,5% de DSPE-PEG(2000)PDP, 65% d'*E.coli* / 34,5% de POPC / 0,5% de DSPE-PEG(2000)PDP, 0% d'*E.coli* / 99,5% de POPC / 0,5% de DSPE-PEG(2000)PDP) sont ajoutés sur la surface du quartz. Les liposomes sont préparés avec une solution tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2mM. Les suspensions de liposomes de concentration 0,1 mg/mL à la vitesse de 100 μ L/min sont ajoutées pendant 25 minutes. Un rinçage avec une solution tampon est ensuite réalisé pendant 15 minutes. Une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL est ajoutée à la vitesse de 50 μ L/min. Du tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2mM est ensuite injecté afin de laver la surface et d'éliminer le matériel non adsorbé sur la surface.

Lors de l'injection de liposomes composés exclusivement de molécules lipidiques de POPC (0% *E.coli* / 100% POPC), la fréquence de résonance diminue rapidement jusqu'à une valeur qui se stabilise à -140 Hz (Figure 114). Cette valeur n'est pas modifiée lors du lavage de la surface indiquant que le matériel ajouté (*les liposomes*) est adsorbé sur la surface d'or. Une solution d'alpha peptide de concentration 0,05 mg/mL a ensuite été injectée. L'addition de cette solution d'alpha peptide modifie les fréquences de résonance mesurées provoquant une diminution supplémentaire de la fréquence de résonance suivie d'une augmentation de cette fréquence de résonance. Ceci est dû à l'ajout d'alpha peptide qui s'incorpore dans les liposomes et leur permette de s'ouvrir en relarguant la solution aqueuse qu'ils contiennent¹⁰. Lors de l'étape de lavage réalisée afin d'éliminer les éléments non liés à la surface, la valeur de la variation de fréquence relevée est de l'ordre de -40 Hz indiquant que du matériel reste adsorbé sur la surface.

Dans le cas où 68% d'extrait total d'*E.coli* sont utilisés pour former des liposomes, la même allure de courbe est observée. Néanmoins, la remontée de la fréquence après l'ajout de la solution d'alpha peptide et le lavage est beaucoup plus faible ($\Delta F = -100$ Hz) que celle observée précédemment. Ceci indique qu'une quantité plus importante d'éléments est présente sur la surface suggérant qu'une tBLM complète n'est pas produite dans ce cas.

En revanche, la courbe contenant 65% de molécules lipidiques d'extrait total d'*E.coli* a un comportement similaire à celle présentée pour une composition de liposomes de 100% de POPC indiquant la formation d'une tBLM.

Une bicouche lipidique espacée et ancrée (tBLM) biomimétique a donc été mise en place à partir de suspensions de liposomes composées de 65% d'*E.coli* / 34,5% de POPC / 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP.

2.2. Incorporation d'Aquaporine Z

Pour étudier l'influence de la bicouche lipidique ancrée et espacée biomimétique mise au point sur la production de l'AqpZ par un système CFPS, les solutions de CFPS « témoin » et CFPS « AqpZ » sont ajoutées sur les tBLMs biomimétiques et sur les tBLMs synthétiques (Figure 115).

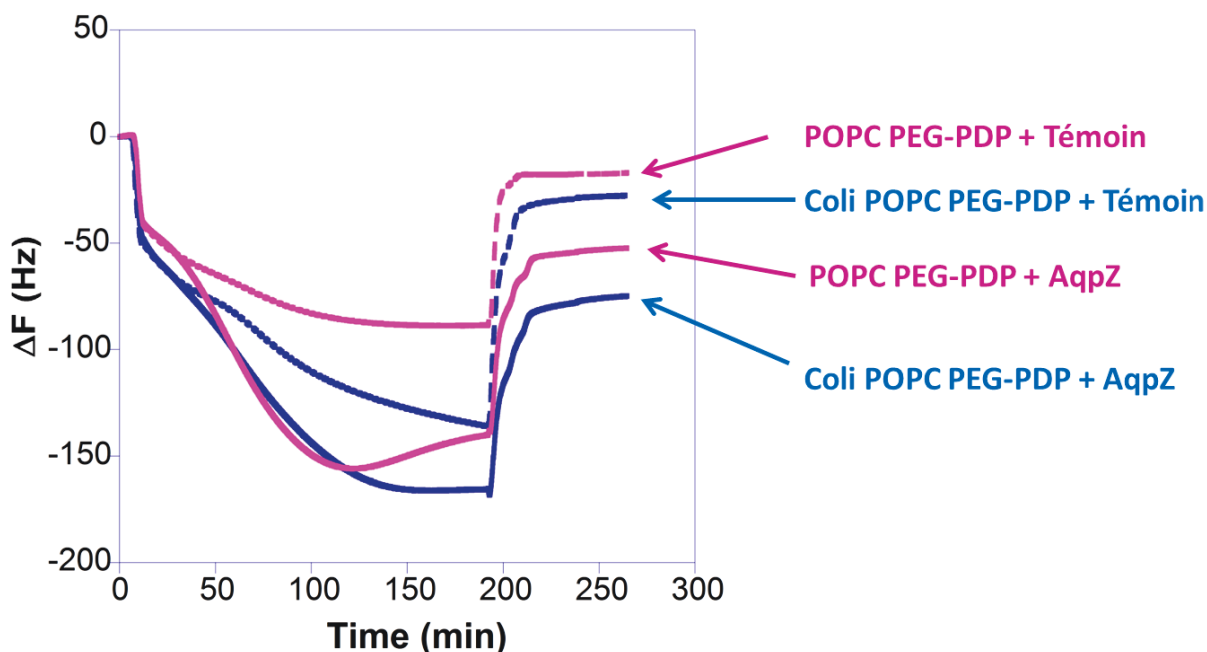


Figure 115 : Mesures de l'incorporation de l'aquaporine Z et d'un contrôle (sans plasmide d'ADN ajouté dans le CFPS) par QCM-D sur les tBLMs formées à partir de solutions de liposomes de ratio molaire 65% *E.coli*, 34,5% POPC, 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP, soit 99,5% POPC, 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP. Une fois les SLBs formées, la température de la chambre de QCM-D est ajustée à 30°C. Après stabilisation des signaux, la mesure est réinitialisée (non montré sur la figure) puis les solutions de CFPS sont injectées à la vitesse de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. Une fois que les chambres de QCM-D contiennent le CFPS, le flux est arrêté pendant 3 heures. Un lavage est ensuite effectué avec du tampon PBS pendant 20 min à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ puis pendant 20 min à 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ et enfin pendant 20 minutes à 80 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ces mesures ont été effectuées à 3 reprises.

Suite à l'injection des solutions de CFPS « témoin » et CFPS « AqpZ » sur les deux différentes tBLMs, une diminution de la fréquence est observée correspondant à l'ajout du matériel de CFPS ajouté sur la surface.

L'ajout du CFPS témoin sur la tBLM composée à 99,5 % de molécules lipidiques POPC et de 0,5 % de DSPE-PEG(2000)PDP, induit une faible diminution de la fréquence de résonance qui atteint la valeur de -75 Hz après 3 heures d'expression. Un lavage de la surface connu pour éliminer le matériel non lié à la surface est effectué. Au cours de ce dernier, la variation de la fréquence augmente rapidement indiquant qu'une grande partie du matériel a été éliminé. La fréquence de résonance en fin d'expérience est de -20 Hz montrant que du matériel reste lié à la surface de la tBLM. Dans le cas où une solution de CFPS portant le gène de l'aquaporine Z est injectée, une diminution plus importante de la

fréquence de résonance est mesurée. Après 3 heures d'expression protéique, la valeur de fréquence de résonance est de -160 Hz. Comme pour le CFPS témoin, un lavage est ensuite opéré induisant une forte et rapide remontée de la fréquence de résonance jusqu'à atteindre une valeur de -53 Hz indiquant que du matériel biologique reste présent sur la surface.

Les expériences dans lesquelles les solutions de CFPS « témoin » et CFPS « AqpZ » ont été ajoutées sur une bicouche biomimétique composée de 65 % d'extrait total d'*E.coli*, 34,5 % de POPC et de 0,5 % de DSPE-PEG(2000)PDP montrent des comportements similaires à ceux obtenus sur les tBLMs synthétiques.

Les expériences que nous avons menées avec la technique de QCM-D montrent qu'après une phase de lavage la variation de fréquence n'est pas nulle. Ceci est dû, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, à une interaction du système CFPS avec la tBLM. La différence moyenne calculée lors de plusieurs expériences menées entre les solutions « AqpZ » et CFPS « témoin » sur les tBLMs de deux compositions différentes ont le même ordre de grandeur (-50/-55 Hz) confirmant une production de protéines et une adsorption à la surface des tBLMs. En outre, ceci semble confirmer la non incidence de la composition de la bicouche lipidique sur la production de protéines membranaires.

Il reste néanmoins à déterminer si la composition lipidique a un rôle sur l'incorporation de protéines dans les tBLMs. Pour y répondre, la viscoélasticité de la surface caractérisant sa déformation suite à l'ajout des solutions de CFPS est étudiée (Figure 116).

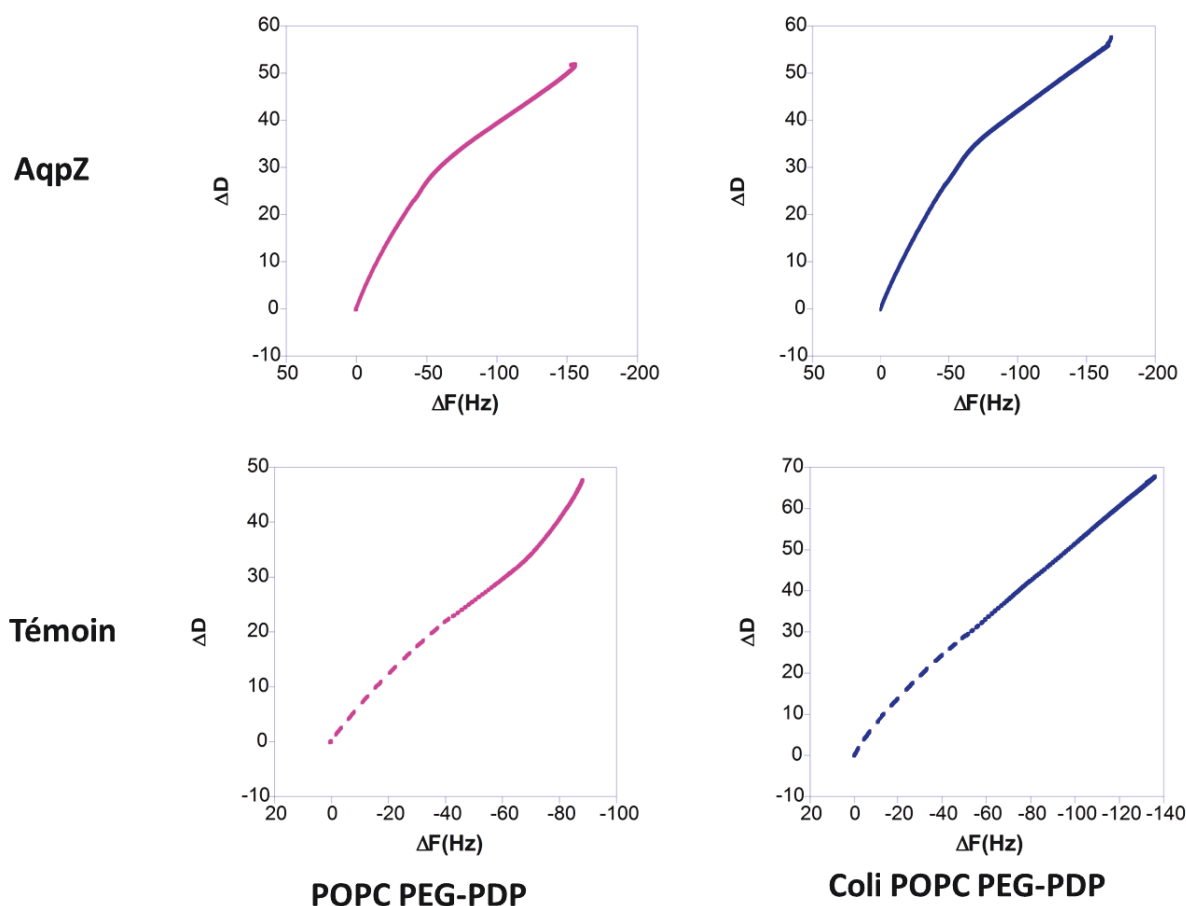


Figure 116 : Variations de la dissipation en fonction de la variation de fréquence obtenues pour l'Aqp Z et le témoin (sans ajout de plasmide dans le CFPS) par QCM-D sur des tBLMs de composition 65% *E.coli*, 34,5% POPC, 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP, soit 99,5% POPC, 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP. Une fois les SLBs formées, la température de la chambre de QCM-D est ajustée à 30°C. Après stabilisation des signaux, la mesure est réinitialisée (non montré sur la figure) puis les solutions de CFPS sont incubées pendant 3 heures avant rinçage avec du tampon de solution.

Lorsque la solution de CFPS « témoin » est ajoutée sur une tBLM de composition 99,5% POPC, 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP (ΔF comprise entre 0 Hz et -88 Hz), la variation de la dissipation augmente proportionnellement à celle de la fréquence de résonance signifiant que la surface non modifiée suite à l'ajout du matériel biologique de CFPS est fortement viscoélastique. Le même comportement est constaté pour le témoin ajouté sur la tBLM de composition 65% *E.coli*, 34,5% POPC. Les expériences menées montrent donc que lors de l'ajout d'une solution de CFPS « témoin », il n'y a pas de modifications de l'état de surface.

En revanche, dans le cas où une solution de CFPS contient le plasmide d'ADN portant un gène codant pour l'Aquaporine Z est ajoutée sur une tBLM de composition 99,5% POPC, 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP, une rupture de la linéarité est observée. La première phase a une allure identique à celle décrite pour le témoin indiquant que la surface est fortement viscoélastique. Puis, une cassure apparaît durant laquelle la dissipation augmente peu alors que la fréquence de résonance augmente rapidement. Ce changement de comportement,

signifie que la surface se rigidifie et indique une modification de la surface. Le même comportement est observé dans le cas de l'ajout d'une solution de CFPS « AqpZ » sur une tBLM biomimétique. Le réarrangement de la surface observé indique une incorporation de protéines dans la membrane.

Le comportement des solutions de CFPS « témoin » ainsi que celui des solutions de CFPS « AqpZ » sur les tBLMs de composition lipidique synthétique (0,5% DSPE-PEG(2000)PDP / 99,5% POPC) et biomimétique (0,5% DSPE-PEG(2000)PDP / 65% *E.coli* / 34,5% POPC) est similaire. Ces résultats confirment donc que la composition lipidique d'une bicouche lipidique biomimétique n'a pas d'impact sur la production et l'incorporation de protéines.

3. Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif de mettre au point une bicouche lipidique plane (SLB ou tBLM) biomimétique, c'est-à-dire de composition la plus proche possible de celle d'une bicouche lipidique native. Des lipides totaux extraits d'*E.coli* ont été choisis afin de mener ce projet. Nous avons montré que l'utilisation de liposomes composés exclusivement de ces molécules lipidiques permet la formation de bicouches lipidiques partielles sur la surface. Afin de former une bicouche lipidique biomimétique recouvrant toute la surface, des liposomes composés de différents ratios molaires de POPC et d'*E.coli* ont été testés. Il est alors apparu qu'un ratio de 68% d'extrait total d'*E.coli* et 32% de POPC permet de former une SLB sur une surface de SiO₂, ce ratio est de 65% d'extrait total d'*E.coli*, 34,5% POPC et 0,5% DSPE-PEG(2000)PDP pour former la tBLMs sur surface d'or.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la composition lipidique d'une bicouche lipidique plane sur la production et l'incorporation de protéines (alpha hémolysine-eGFP et aquaporine Z) produites par un système d'expression acellulaire (CFPS). Il est alors apparu que pour les deux bicouches lipidiques planes formées, la composition lipidique « biomimétique » n'affecte pas la production et l'incorporation des protéines membranaires que nous avons utilisées pour cette étude. Cependant, cette étude ne nous permet pas de conclure sur la bonne insertion et la fonctionnalité de ces protéines dans ces deux types de bicouches lipidiques planes.

4. Références

1. Shechter, E. *Biochimie et biophysique des membranes: aspects structuraux et fonctionnels*. (Masson, 1997).
2. Stelzle, M., Weissmueller, G. & Sackmann, E. On the application of supported bilayers as receptive layers for biosensors with electrical detection. *J. Phys. Chem.* **97**, 2974–2981 (1993).
3. Elie-Caille, C., Fliniaux, O., Pantigny, J., Mazière, J.-C. & Bourdillon, C. Self-Assembly of Solid-Supported Membranes Using a Triggered Fusion of Phospholipid-Enriched Proteoliposomes Prepared from the Inner Mitochondrial Membrane ¹. *Langmuir* **21**, 4661–4668 (2005).
4. Merz, C., Knoll, W., Textor, M. & Reimhult, E. Formation of supported bacterial lipid membrane mimics. *Biointerphases* **3**, FA41 (2008).
5. Dodd, C. E. *et al.* Native E. coli inner membrane incorporation in solid-supported lipid bilayer membranes. *Biointerphases* **3**, FA59 (2008).
6. Keller, C. A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* **75**, 1397–1402 (1998).
7. Liang, X., Mao, G. & Simon Ng, K. Y. Probing small unilamellar EggPC vesicles on mica surface by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **34**, 41–51 (2004).
8. Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P. & Kasemo, B. Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **84**, 5443 (2000).
9. Hovijitra, N. T., Wu, J. J., Peaker, B. & Swartz, J. R. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes. *Biotechnol. Bioeng.* **104**, 40–49 (2009).
10. Cho, N.-J. *et al.* Alpha-Helical Peptide-Induced Vesicle Rupture Revealing New Insight into the Vesicle Fusion Process As Monitored *in Situ* by Quartz Crystal Microbalance-Dissipation and Reflectometry. *Anal. Chem.* **81**, 4752–4761 (2009).

Chapitre 4 : Etude de la fonctionnalité des protéines membranaires

Nous avons montré qu'il était possible d'incorporer des protéines membranaires dans une SLB ou une tBLM à l'aide des techniques de caractérisation à notre disposition (AFM¹, QCM-D^{2,3}, SPR^{4,5}, FRAP^{6,7}). Néanmoins, nous n'avons pas démontré que ces protéines membranaires étaient bien insérées et fonctionnelles dans les bicouches lipidiques planes que nous avons formées. Suite à ce constat, nous nous sommes intéressés aux différentes techniques pouvant répondre à cette attente. Une des techniques permettant de caractériser la fonctionnalité des protéines réside dans la mesure de la conductivité ionique à travers des membranes suspendues qui sont en fait des bicouches lipidiques formées à travers une ouverture entre deux environnements aqueux (*cf. partie I : état de l'art*). C'est pourquoi, nous avons initié une collaboration avec Bruno Lepioufle (ENS Cachan) afin de mesurer la conductivité ionique à travers un pore membranaire sur une membrane suspendue (pour laquelle nous avons accès aux deux compartiments). Dans le cadre de cette thèse, nous avons principalement étudié deux protéines membranaires : l'alpha hémolysine⁸⁻¹⁰ et l'aquaporine Z¹¹⁻¹³. La première présente la particularité d'être un pore membranaire dont la conductivité peut être mesurée. En outre, la conductivité de cette protéine produite par un système classique de production protéique a déjà été reportée (Figure 117). C'est donc tout naturellement sur cette protéine membranaire que nos travaux se sont portés.

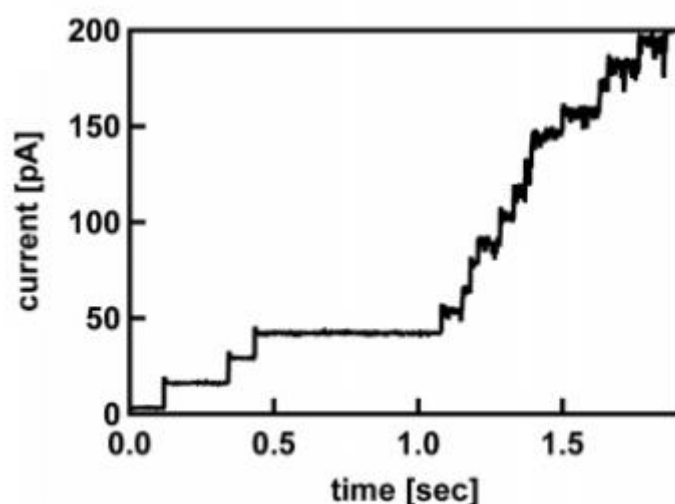


Figure 117 : Courant ionique mesuré à travers des pores membranaires d'alpha hémolysine (provenant de chez Sigma). Le voltage appliqué est de 60 mV ¹⁴.

Dans ce chapitre, nous détaillerons le système de mesure de conductivité ionique utilisé ainsi que la formation de la bicouche lipidique se faisant par la technique dite de « painting ». Nous préciserons également comment nous avons procédé afin d'incuber le système d'expression protéique acellulaire (CFPS) induisant la production de l'alpha hémolysine. Nous présenterons en finalité les résultats de mesures de conductivité obtenus.

1. Mesures de conductance: système expérimental

1.1. Le système expérimental

Pour fabriquer la puce (Figure 118), 3 étapes décrites par Lepioufle et coll.¹⁵ doivent être réalisées. Nous les résumons ci-après. Dans un premier temps (Figure 119), un film de parylène de 10 μm est déposé par la technique de « Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition » (PECVD). Un masque en aluminium possédant des ouvertures de diamètre 45 μm est placé sur ce film de parylène. Les trous sont ensuite obtenus par la méthode de gravure ionique réactive (RIE) par plasma à oxygène. Le masque en aluminium est ensuite ôté et le film de parylène est décollé de la surface de silicium à l'aide de pinces.

Des substrats de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) sont usinés pour obtenir deux plaques : l'une constituant la plaque de fond qui inclue le canal fluidique, l'autre constituant la plaque du dessus et comportant un réservoir.

Pour finir, une couche adhésive sensible aux UVs est utilisée pour lier le film de parylène aux deux plaques de PMMA. Une lamelle de verre est ensuite collée, ce afin de fermer le canal fluidique.

Les signaux électriques seront mesurés à l'aide de 2 électrodes Ag/AgCl connectées à un amplificateur patch-clamp (Axon Axopatch 200B, Molecular Devices, USA). L'une des électrodes sera positionnée dans le canal fluidique et l'autre dans le compartiment servant de réservoir (Figure 119).

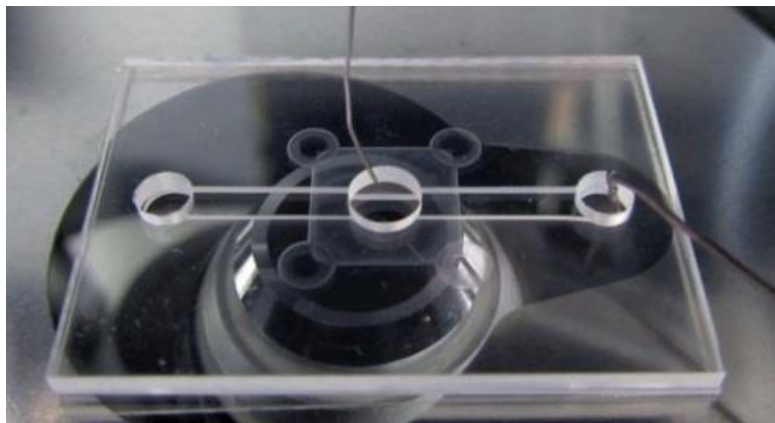


Figure 118 : Vue du système microfluidique au microscope optique¹⁵.

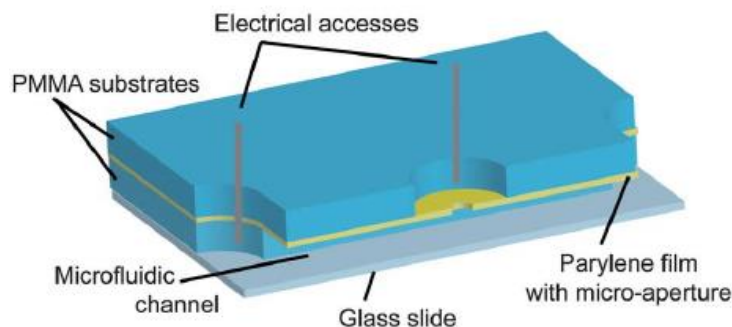


Figure 119 : Schéma de la structure du système. Le système est composé d'un film de parylène pris en sandwich entre 2 plaques de PMMA¹⁵.

1.2. Formation de la bicouche suivie de l'incorporation de protéines.

Dans le but de déterminer si les protéines membranaires produites par le système d'expression protéique acellulaire sont fonctionnelles, une bicouche lipidique suspendue doit être formée. Pour cela, 20 μL de solution tampon de pH 7,4 composée de 150 mM de KCl et 10 mM d'HEPES sont déposées dans le compartiment du dessus. Nous ajoutons ensuite dans le compartiment du dessous (canal) 8 μL de la solution de lipides Egg-PC dilués dans du décane à une concentration de 20 mg/mL. Un volume de 40 μL de tampon est ensuite injecté dans le compartiment du dessous pour « broser » les lipides, conformément à la technique dite de « painting » (*cf. partie I : état de l'art*) et former ainsi une bicouche lipidique à proprement parler. Le contrôle de la formation et de la qualité de la bicouche lipidique se fait à la fois par observation au microscope optique (présence ou non d'un anneau de Gibbs, anneau qui apparaît autour de la bicouche lipidique et se rétrécit vers les bords du trou sous l'influence d'un champ électrique) et par mesures électriques.

Après que la bicouche lipidique suspendue soit formée, 6 μL d'une solution du système de synthèse protéique acellulaire (CFPS) sont ajoutés dans le compartiment du dessus (Figure 120). Les signaux électriques sont mesurés à l'aide de 2 électrodes Ag/AgCl connectées à un amplificateur patch-clamp.

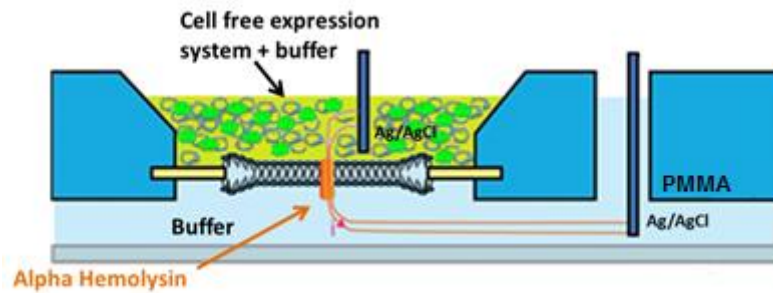


Figure 120 : Vue en coupe d'un canal ionique reconstitué dans une bicouche lipidique suspendue. La conductance de ce canal est mesurée à l'aide de deux électrodes Ag/AgCl dont l'une est dans le compartiment du dessus (chambre) et l'autre dans celui du dessous (canal)¹⁵.

2. Mesure de la conductance de canaux ioniques : résultats

La solution de CFPS contenant l'ADN plasmidique portant le gène codant pour l'alpha hémolysine est incubée pendant environ 30 minutes avant l'obtention des premiers signaux électriques (mesures $I(V)$ du passage d'ions à travers le canal ionique).

Ce délai peut correspondre au temps de production des protéines et/ou au temps nécessaire de réarrangement des protéines pour s'intégrer dans la membrane lipidique. La Figure 121 montre les courants ioniques enregistrés sur une période de 10 secondes.

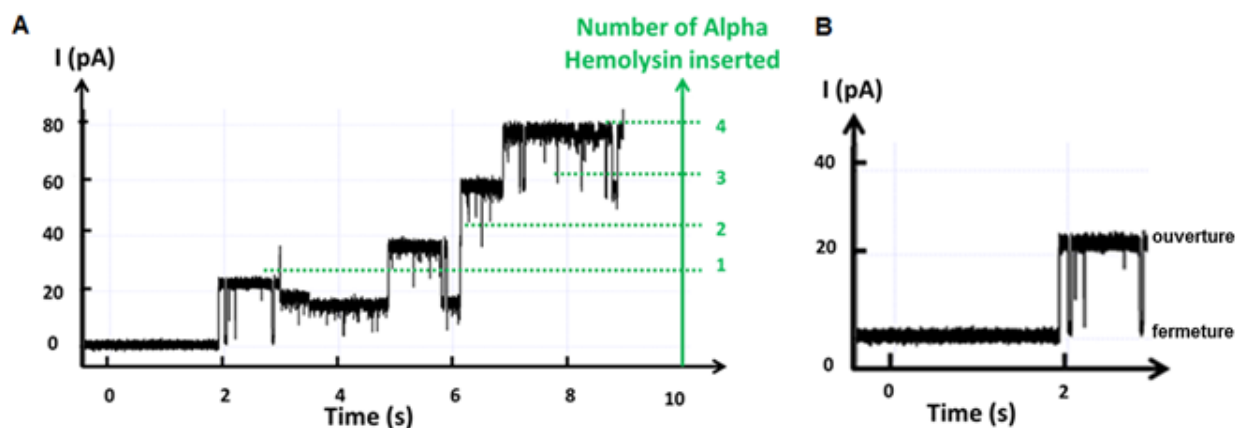


Figure 121 : Courants ioniques à travers les pores membranaires d'alpha hémolysine enregistrés au cours du temps. A) Mesure de conductivité sur une période de 10 secondes. B) Gros plan montrant un nanopore incorporé.

Un signal de nanopore d'alpha hémolysine unique est représenté sur la Figure 121b. Un pas de 23 ± 2 pA est observé sur cette figure. Cette valeur correspond à une conductance de 0,15 nS. La mesure de signaux électriques comparée aux données de la littérature obtenues pour des protéines d'alpha hémolysine produites classiquement dans des micro-organismes (Figure 117) confirme l'insertion et la fonctionnalité de la protéine alpha hémolysine produite par le CFPS dans la bicouche lipidique suspendue.

Suite à cette incorporation des diminutions et remontées très rapide du courant ionique mesuré de 23 pA sont observées sur des temps très courts. Ceci correspond à des phénomènes d'ouvertures et de fermetures des pores membranaires suggérant une fluctuation du passage des ions à travers le pore membranaire. Entre 3 et 5 secondes de mesures de conductivité ioniques enregistrées (Figure 121a), une réduction de la taille du signal créneau de 8 pA est observée. Ceci signifie qu'une réduction de la taille du canal ionique a été opérée. Pour expliquer cette observation, deux hypothèses peuvent être formulées. 1) Le nombre d'ions passant à travers le canal est diminué. 2) L'ouverture du canal ionique est plus grande. Cette deuxième hypothèse est peu probable sachant que la taille du pore membranaire varie peu. 3) Le pore est gêné par le système d'expression protéique présent en solution.

Après 5 secondes d'enregistrement, le signal mesuré augmente de 23 pA indiquant l'insertion d'une deuxième protéine alpha hémolysine dans la bicouche lipidique suspendue. Les mêmes phénomènes de fermeture et d'ouverture sur de courts instants sont également observés. Ce canal est fermé pendant 20 millisecondes suggérant un empêchement de passage d'ions à travers le pore peut être du aux éléments du CFPS présents en solution dans le réservoir.

Après environ 6 secondes, une augmentation de 46 pA est observée signifiant que deux protéines sont insérées dans la bicouche lipidique. Il y a donc à cet instant trois alpha hémolysine insérées et fonctionnelles dans la bicouche lipidique.

Après 7 secondes une quatrième insertion est mesurée.

3. Conclusion

Par l'utilisation de ce dispositif, nous avons démontré que des nanopores d'alpha hémolysine produits par un système d'expression acellulaire pouvaient s'insérer dans des bicouches lipidiques dites suspendues. Le résultat présenté, montrant la fonctionnalité des protéines membranaires produites par un tel système, est encourageant. Des expériences complémentaires avec d'autres protéines membranaires doivent être envisagées. Néanmoins, ce système ne permet que la mesure du passage d'ions. De ce fait, il ne peut être utilisé que pour l'étude de protéines formant des canaux ioniques. Nous ne pouvons donc pas déterminer la fonctionnalité de protéines telle l'Aquaporine Z transporteur d'eau, protéine que nous avons étudiée dans le cadre des bicouches lipidiques espacées (tBLM).

4. Références

1. Frederix, P. L. T. M., Bosshart, P. D. & Engel, A. Atomic Force Microscopy of Biological Membranes. *Biophys. J.* **96**, 329–338 (2009).
2. Cho, N.-J., Frank, C. W., Kasemo, B. & Höök, F. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nat. Protoc.* **5**, 1096–1106 (2010).
3. Keller, C. A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* **75**, 1397–1402 (1998).
4. Cooper, M. A., Try, A. C., Carroll, J., Ellar, D. J. & Williams, D. H. Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1373**, 101–111 (1998).
5. Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J. H. & Anderluh, G. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* **141**, 169–178 (2006).
6. Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* **41**, 95–97 (1983).
7. Pucadyil, T. J., Mukherjee, S. & Chattopadhyay, A. Organization and Dynamics of NBD-Labeled Lipids in Membranes Analyzed by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *J. Phys. Chem. B* **111**, 1975–1983 (2007).
8. Gouaux, E. [alpha]-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An Archetype of [beta]-Barrel, Channel-Forming Toxins. *J. Struct. Biol.* **121**, 110–122 (1998).
9. Czajkowsky, D. M., Sheng, S. & Shao, Z. Staphylococcal [alpha]-hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.* **276**, 325–330 (1998).
10. Song, L. *et al.* Structure of Staphylococcal alpha -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. *Science* **274**, 1859–1865 (1996).
11. Calamita, G. The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.* **37**, 254–262 (2000).
12. Savage, D. F., Egea, P. F., Robles-Colmenares, Y., Iij, J. D. O. & Stroud, R. M. Architecture and Selectivity in Aquaporins: 2.5 Å X-Ray Structure of Aquaporin Z. *PLoS Biol.* **1**, e2 (2003).
13. Scheuring, S. High resolution AFM topographs of the *Escherichia coli* water channel aquaporin Z. *EMBO J.* **18**, 4981–4987 (1999).
14. Le Pioufle, B., Suzuki, H., Tabata, K. V., Noji, H. & Takeuchi, S. Lipid Bilayer Microarray for Parallel Recording of Transmembrane Ion Currents. *Anal. Chem.* **80**, 328–332 (2008).
15. Wang, W. *et al.* Activity monitoring of functional OprM using a biomimetic microfluidic device. *The Analyst* **137**, 847 (2012).

Bilan et perspectives

Ce travail de thèse visait à développer des bicouches lipidiques planes dans lesquelles des protéines membranaires intégrales seraient insérées et fonctionnelles. L'originalité de ce travail consiste en l'utilisation d'un système d'expression protéique acellulaire pour produire deux protéines membranaires modèles : l'alpha hémolysine et l'aquaporine Z.

Dans un premier chapitre, des bicouches lipidiques supportées (SLB) ont été formées à partir de liposomes composés de 100% de molécules lipidiques de phosphatidylcholine (POPC) sur des surfaces de SiO₂. Un système d'expression protéique acellulaire (CFPS) portant le gène de l'alpha hémolysine ou celui de l'alpha hémolysine-eGFP avait ensuite été ajouté sur la surface durant une période de 3 heures. Nous avons alors montré que ces protéines sont produites et s'incorporent dans la SLB.

Dans un second chapitre, nous avons voulu augmenter l'espace entre la surface et la bicouche lipidique dans l'objectif de mieux incorporer les protéines membranaires intégrales dont les structures en 3D de celles-ci requièrent de l'espace de part et d'autre de la bicouche. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un polymère non toxique qui présente d'excellentes caractéristiques de mouillage : le polyéthylène glycol. Ce PEG est liée d'une part à une molécule lipidique permettant son accrochage à la bicouche lipidique. D'autre part, il est lié par son autre extrémité *via* des liaisons hydrogène à un groupe terminal. Nous avons mis au point une tBLM par fusion directe de liposomes sur une surface de SiO₂ et par fusion des liposomes induite à l'aide d'un alpha peptide. Après plusieurs essais infructueux sur une surface de SiO₂, nous avons montré que seule une tBLM formée sur une surface d'or permettait la production de la protéine aquaporine Z par le CFPS ainsi que son incorporation dans la bicouche lipidique pour un faible pourcentage de PEG. En effet, si la quantité de PEG est trop élevée, la production protéique par le système d'expression protéique acellulaire peut être inhibée et l'incorporation de la protéine peut être gênée.

Dans un troisième chapitre, nous avons comparé les membranes planes dites « modèles » mises au point dans les deux premiers chapitres avec des membranes lipidiques biomimétiques (de composition la plus proche possible de la membrane d'*E.coli*). Nous avons obtenu une bicouche lipidique plane en mélangeant des extraits lipidiques totaux d'*E.coli* avec le POPC, molécule lipidique synthétique. La comparaison de l'incorporation de protéines membranaires produites par le système d'expression acellulaire entre ces deux types de membranes n'a mis en évidence aucune différence.

Dans un dernier chapitre, nous avons montré que la protéine alpha hémolysine produite par le CFPS dans une membrane suspendue est fonctionnelle, validant ainsi l'insertion de protéines membranaires intégrales. Cette vérification n'a pas pu être effectuée pour l'aquaporine Z qui n'est pas une protéine formant un canal ionique comme l'alpha hémolysine, empêchant ainsi la mesure de la conductivité. Pour ce type de protéines membranaires des solutions alternatives doivent être envisagées, comme par exemple une mesure de la pression osmotique. Dans le cas de protéines de type transporteur ou de récepteur, des tests d'activité enzymatique ou de liaison à des ligands devront également être considérés.

Il a ainsi été montré que des solutions de système d'expression protéique acellulaire directement incubées sur des bicouches lipidiques planes permettent la production des protéines et leur insertion dans une conformation correcte et fonctionnelle. Néanmoins, l'impact de la non purification de ces protéines au cours de cette étude n'a pas été abordée dans ce manuscrit. La technique de QCM-D, indique que lors de l'étape de lavage suivant l'incubation d'une solution témoin (sans plasmide ajouté) sur une membrane lipidique plane, tout le matériel du système d'expression acellulaire est éliminé. Ceci n'est en réalité pas exact. Lors de l'étude de ces surfaces à l'aide de la microscopie à force atomique, il est apparu que des éléments tels que des ribosomes sont observés posant la question de l'imagerie de ces surfaces pour déterminer la structure des protéines et montrant également la limite des techniques utilisées au cours de ces travaux.

Les résultats obtenus au cours de ces trois ans de thèse constituent une première étape vers la mise au point de biodétecteurs permettant de caractériser les protéines membranaires produites dans une bicouche lipidique plane. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour l'obtention d'un biodétecteur :

- Un système de membrane suspendue permettant de mesurer la fonctionnalité de protéines membranaires semble être le système le plus adapté à la mise au point d'un biodétecteur puisqu'il permet la mesure de la fonctionnalité de pores membranaires. Néanmoins, pour permettre l'étude d'un plus grand nombre de protéines membranaires, il est envisageable de coupler une mesure électrique à une réaction enzymatique ou à une liaison entre une protéine et son ligand mais également d'effectuer des mesures de fluorescence. Pour cela, un accès pratique à la solution présente dans le canal ionique serait requis. Une thèse visant à répondre à ces attentes est actuellement en cours dans notre laboratoire.
- Il est aussi envisageable de détecter la fonctionnalité protéique en formant des bicouches lipidiques sur des nanotubes de carbone permettant de mesurer un courant comme reporté

dans les travaux de Zhou et coll.¹ . L'avantage de l'utilisation de nanotubes de carbone est que les techniques utilisées au cours de ces travaux de thèse (QCM-D, SPR, FRAP) pourraient être également utilisées apportant des informations complémentaires à la seule fonctionnalité des protéines.

1. Zhou, X., Moran-Mirabal, J. M., Craighead, H. G. & McEuen, P. L. Supported lipid bilayer/carbon nanotube hybrids. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 185–190 (2007).

Annexes

A. Annexe 1 : La mesure d'angle de contact

La mesure d'angle de contact est une méthode permettant de connaître la « mouillabilité » caractérisant l'étalement d'une goutte de liquide sur une surface solide mais également de calculer l'énergie de surface.

Principe de fonctionnement de la technique

Une goutte d'un liquide est déposée sur une surface solide plane. Si le liquide est fortement attiré par la surface, cas de l'eau sur un support hydrophile, la goutte est totalement étalée sur la surface, et l'angle de contact est proche de 0° . Si l'angle de contact est inférieur à 90° , la surface est considérée hydrophile, s'il est supérieur à 90° , la surface est considérée comme hydrophobe et s'il est supérieur à 150° la surface est super hydrophobe. Plus la surface est hydrophobe et plus la goutte reste intacte sur la surface (Figure 122).

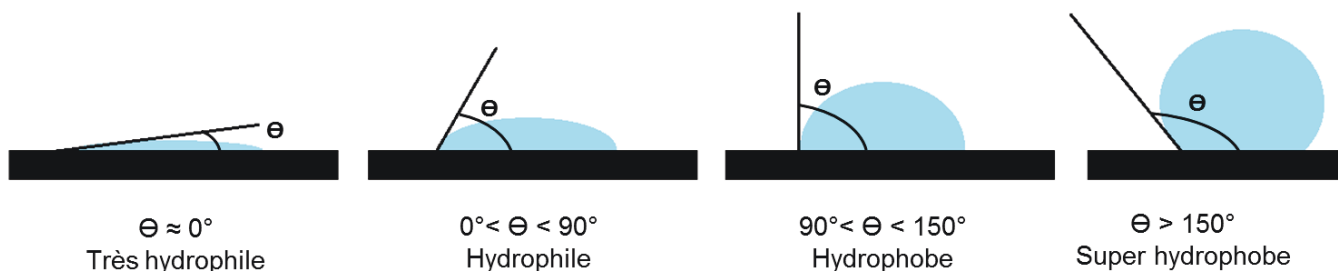


Figure 122 : Schéma montrant les différents angles de contact caractéristiques de surfaces hydrophiles ou hydrophobes

Dans le cas d'un mouillage partiel, une ligne de contact délimite trois phases : une phase solide, une phase liquide et une phase vapeur (Figure 123). L'angle de contact dépend donc de trois interfaces : solide-vapeur γ_{sv} , solide-liquide γ_{sl} liquide-vapeur γ_{lv} .

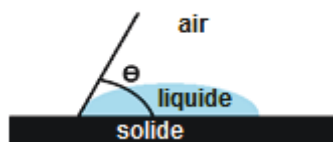


Figure 123 : Schéma représentant les trois phases caractéristiques d'un mouillage partiel d'une surface.

L'angle de contact à l'équilibre est défini par l'équation de Young : $\gamma_{sv} - \gamma_{sl} - \gamma_{lv} \cos\theta = 0$ ²

1. De Gennes, P. Wetting: statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics* **57**, 827–863 (1985).

Il est également nécessaire pour la formation d'une SLB sur une surface d'or que la surface d'or ait un angle de contact inférieur à 35°. Ceci nécessite de déterminer les paramètres du plasma à oxygène que nous avons à disposition. Les mesures d'angle de contact ont été déterminées à l'aide d'un digidrop (GBX).

Les photographies prises après le dépôt d'une goutte d'eau (Figure 124) et le Tableau 10 récapitulatif des angles de contact mesurés montrent la nécessité d'utiliser une faible puissance de plasma à oxygène Tépla. Nous avons donc opté pour les paramètres 200W, 1000mL/min pendant 5 minutes.

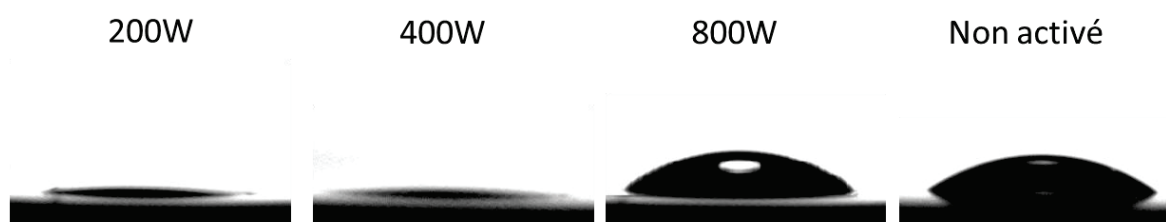


Figure 124 : Photographies des angles de contact obtenus lors de l'ajout d'une goutte d'eau sur une surface d'or pour différents traitement oxydatifs effectués avec un plasma à oxygène Tépla.

	Angle de contact moyen
Sans activation	66,9
800W 1000mL/min 5 min avec cage de Faraday	35,9
400W 1000mL/min 5 min avec cage de Faraday	9,2
200W 1000mL/min 5 min avec cage de Faraday	6,95

Tableau 10 : angles de contacts mesurés à partir des photos réalisées pour les différents traitements oxydatifs réalisés à l'aide d'un plasma à oxygène Tépla.

B. Annexe 2 : Contributions scientifiques

Revue internationale :

- A. Coutable, I. Randrianjatovo, V. Noireaux, C. Vieu, C. Thibault, E. Trévisiol, JM. François, A Comparative Study of α -Hemolysin Expression in Supported Lipid Bilayers of Synthetic and Enriched Complex Bacterial Lipid, *BioNanoScience* (2014), 4.
- A. Coutable, J. Chalmeau, V. Noireaux, JM. François, C. Thibault, E. Trévisiol, Preparation of Tethered-Lipid Bilayers on Gold Surfaces for the Incorporation of Integral Membrane Proteins Synthesized by Cell-Free Expression, *Langmuir* (2014), 30
- C. Formosa, M. Grare, E. Jauvert, A. Coutable, J. B. Regnouf-de-Vains, M. Mourer, R. E. Duval, E. Dague, Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain, *Scientific Reports* (2012), 2
- A. Cerf, X. Dollat, J. Chalmeau, A. Coutable, C. Vieu, A versatile method for generating single DNA molecule patterns: through the combination of directed capillary assembly and (micro/nano)contact printing, *Journal of Materials Research Focus Issue on Self-Assembly and Directed Assembly of Advanced Materials* (2011), 26

Communications orales

- A. Coutable et al. Nanobioeurope Meeting, June 10-12^{sd} 2013, Toulouse
- A. Coutable, Biophysical Society 57th Annual Meeting, February 2-6th 2013, Philadelphia, PA.

Communications par posters

- « Journées Nationales Nanosciences et Nanotechnologies » (J3N), Bordeaux, France, November 7-9, 2012
- « Journées Nationales Nanosciences et Nanotechnologies » (J3N), Strasbourg, France, November 7-9, 2011
- CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, Germany, September 7-10, 2011

Résumé / Abstract

Les protéines membranaires intégrales jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité cellulaire (transports d'ions et de nutriments, transduction de signal, interaction cellule-cellule). Afin de les étudier, ces protéines doivent être produites *in vitro*. La production classique de ces protéines membranaires intégrales dans des microorganismes présente de nombreuses difficultés liées à leur structure complexe mais aussi à des problèmes de toxicité, empêchant la production de nombre d'entre elles. En outre, pour être produites efficacement, ces protéines ont besoin d'un environnement amphiphile. Dans cette thèse, afin de pallier à ces difficultés, nous avons d'une part utilisé un système d'expression protéique acellulaire, non affecté par la physiologie des cellules vivantes. En outre, nous avons choisi de les intégrer dans des bicouches lipidiques planes reconstituées artificiellement. Dans une première partie, nous avons mis au point l'intégration d'une protéine membranaire intégrale formant un pore, l'alpha hémolysine, dans une bicouche lipidique supportée. Certaines protéines nécessitant un espace plus important de part et d'autre de la membrane, nous avons, dans une seconde partie, développé une bicouche lipidique espacée et ancrée par fusion de liposomes sur des surfaces d'or. Nous démontrons qu'il est possible d'y incorporer des protéines membranaires de type Aquaporine Z sous certaines conditions. Dans une troisième partie, dédiée à la formation de membranes biomimétiques utilisant des molécules lipidiques provenant d'*Escherichia coli*, nous montrons que la modification de la composition membranaire ne semble pas avoir d'incidence sur l'incorporation de protéines. Enfin, dans une dernière partie, nous avons réalisé des premiers essais d'insertion de protéines membranaires, de type alpha hémolysine, dans des bicouches suspendues afin de montrer que ces protéines produites par le système d'expression acellulaire sont fonctionnelles.

Integral membrane proteins play an essential role in the cell integrity preservation (transport of nutrients and ions, signal transduction, cell-cell interaction). In order to study these proteins, they have to be produced *in vitro*. Classical production of integral membrane proteins in microorganisms present many difficulties associated with their complex structure and also toxicity problems, preventing production of many of them. Moreover, to be efficiently produced, these proteins require an amphiphilic environment. In order to overcome these difficulties, we used a cell-free protein expression system, unaffected by the physiology of living cells. In addition, we chose to integrate them into artificial planar lipid bilayers. In a first

part, we have developed the integration of an integral membrane protein forming a pore, the alpha hemolysin, in a supported lipid bilayer. Some proteins require more space on each side of the membrane, therefore in a second part, we have developed a tethered lipid bilayer membrane by liposome fusion on gold surfaces. We demonstrate that it is possible to incorporate membrane protein Aquaporin Z under certain conditions. The third part is dedicated to the formation of biomimetic membranes using lipid molecules from *Escherichia coli*, we show that the membrane composition do not affect the protein incorporation. Finally, we have tested alpha hemolysin membrane proteins insertion in suspended lipid bilayers membranes to show that these proteins produced by the cell-free expression system are functional.